PROTEINE DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI K-12 UNTERSUCHUNGEN MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

NIKOLAOS DIMOUDIS

aus

Pyrgos-Thessaloniki

Griechenland

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PROTEINE DER ÄUSSEREN MEMBRAN VON ESCHERICHIA COLI K-12 UNTERSUCHUNGEN MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

NIKOLAOS DIMOUDIS

aus

Pyrgos-Thessaloniki

Griechenland

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	8.2.1984
Dekan:	Professor Dr.E.Kulzer
1.Berichterstatter	Professor Dr.V.Braun
2.Berichterstatter	Priv.Doz.Dr.K.Hantke

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern
Parthenopi und Ioannis Dimoudis
gewidmet

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr.V.Braun am Lehrstuhl Mikrobiologie II,der Universität Tübingen durchgeführt.

Professor Dr.V.Braun danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonders danke ich Herrn Privatdozenten Dr.K.Hantke, Herrn Dr.K.Heller, Herrn Dr.E.Fischer und Herrn Dr.H.Rotering für ihr Interesse und die Anregungen und Hilfen,die ich in Diskussionen mit ihnen erhielt.

Meinen Laborkollegen K.Komischke danke ich für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I & II danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0053

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	MATERIAL	7
2.1.1	Chemikalien	7
2.1.2	Zellkulturmaterial	8
2.1.3	Puffer und Medien	8
2.1.3.1	Puffer	8
2.1.3.2	Medien	8
2.1.3.3	Zellkulturmedien	9
2.1.4	Organismen	10
2.1.4.1	Bakterien	10
2.1.4.2	Bakteriophagen	10
2.1.4.3	Zellinie	10
2.1.4.4	Mäuse	11
2.2	METHODEN	12
2.2.1	Äthanolfällung	12
2.2.2	Acetonfällung	12
2.2.3	Protein-Bestimmung mit der Fluram-Methode	12
2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.2.5	Präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	14
2.2.6	Anfärben von Polyacrylamid-Gelen	14
2.2.7	Elution der Banden aus den Gelen und ausfällen vom SDS	15
2.2.8	Anzucht der Bakterien	15
2.2.9	Herstellung eines Phagenlysats	15
2.2.10	Phagentiterbestimmung	16
2.2.11	Überprüfung der Sensitivität von Bakterienstämmen gegen Phagen und Colicinen	16
2.2.12	Bestimmung der T5-Rezeptoraktivität einer Proteinlösung	17
2.2.13	Isolierung der äußeren Membran	17
2.2.14	Dialyse von Kulturüberständen	18
2.2.15	Züchten der Zellkulturen	18

		Seite
2.2.16	Titer- und Lebendzellzahl-Bestimmung der Zellkulturen	18
2.2.17	Einfrieren der Zellkulturen	19
2.2.18	Auftauen von Zellkulturen	19
2.2.19	Immunisierung von Mäusen	19
2.2.20	Isolierung von Peritoneal-Makrophagen	20
2.2.21	Fusion	20
2.2.22	Klonierung einer Zellkultur	22
2.2.23	Ascites Produktion	23
2.2.24	Reinigung von Peroxidase konjugierten Kaninchen anti-Maus IgG	23
2.2.25	Isolierung von monoklonalen Antikörper über Protein-A-Sepharose	24
2.2.26	Enzymimmunassay (ELISA)	25
2.2.27	Subklassen-Bestimmung der Immunglobuline	27
2.2.28	Beeinflußung der Phagenadsorption an E.coli K12 durch monoklonale Antikörper	28
2.2.29	Kinetik der ColicinM/Colicin B Wirkung	30
2.2.30	Agglutinationstest mit Bakterien	31
2.2.31	Bestimmung des ^{55}Fe-Ferrichrom Transports	31
2.2.32	Hämolyse-Test	32
2.2.33	Enzymimmunologischer Nachweis der Spezifität von Antikörpern mit einzelnen Banden einer PAGE	33
2.2.34	Immunpräzipitation	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1	Hybridomazellinie D24	35
3.1.1	Charakterisierung der angereicherten FhuA-Lösung	35
3.1.2	Immunisierung	35
3.1.3	Fusion	36
3.1.4	Screening der Hybrid-Klone mit ELISA	36
3.1.5	1.Subklonierung,Screening der Subklone und Subklassen-Bestimmung	36
3.1.6	2.Subklonierung,Screening der Subklone und Subklassen-Bestimmung	36
3.1.7	T5-Phagenbindungstest	37
3.1.8	BF23-Phagenbindungstest	38
3.1.9	Colicin M-Test	38

		Seite
3.1.10	Colicin B-Test	40
3.1.11	Agglutination von Bakterienstämmen	40
3.1.12	ELISA-Test (Hauptproteine, FLP, MLP)	42
3.1.13	ELISA-Test (OM von H1426 und LPS)	43
3.1.14	Hämolyse-Test	43
3.1.15	Ferrichrom-Eisentransport	44
3.1.16	Gewinnung von Ascites-Flüssigkeit	45
3.1.17	Colicin M und Colicin B Tests mit Ascites-Flüssigkeit	46
3.2	Hybridomazellinie LP14	48
3.2.1	Immunisierung und Fusion	48
3.2.2	Screening der Hybrid-Klone, Subklonierungen, Subklassen-Bestimmung	48
3.2.3	Agglutinations-Test mit E.coli K12-Stämme	49
3.2.4	Hämolyse-Test	49
3.2.5	Immunpräzipitation	50
3.3	Hybridomazellinie AJ216	52
3.3.1.1	Immunisierung	52
3.3.1.2	Fusion	52
3.3.1.3	Screening der Hybrid-Klone	52
3.3.1.4	Subklonierungen, Screening der Subklonen, und Subklassen-Bestimmung	53
3.3.2	Ergebnisse mit Kulturüberstand der Zellinie AJ216	53
3.3.2.1	ELISA-Test (mit OM des Stammes H1426 und LPS von E.coli K12)	53
3.3.2.2	Agglutinations-Test	54
3.3.2.3	ELISA (Beschichtung mit ganzen Bakterien)	55
3.3.2.4	ELISA mit Banden einer präparativen-Gelelektrophorese	56
3.3.2.5	ELISA (Hauptproteine, MLP, FLP)	58
3.3.3	Ergebnisse mit isolierten Antikörper der der Zellinie AJ216	59
3.3.3.1	Isolierung der Antikörper aus Kulturüberstand der Zellinie AJ216 mit Protein-A-Sepharose	59
3.3.3.2	Charakterisierung der isolierten Antikörper	60
3.3.3.3	ELISA (Beschichtung mit ganzen Bakterien) und Agglutinations-Test mit E.coli K12-Stämmen	61
3.3.3.4	Kinetik der Phagenadsorption an E.coli K12-Stämmen	63

		Seite
3.3.3.5	Kinetik der T5-Adsorption (Stämme:W311O und HO831)	64
3.3.3.6	Kinetik der Ø8O-, und T1-Adsorption(Stamm: HO831)	65
3.3.3.7	Kinetik der T2-Adsorption (Stämme: H315 und 1O24)	67
3.3.3.8	Kinetik der T6-, und TuIb-Adsorption (Stmme: W311O und 72-6)	68
3.3.3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Phagenadsorptions-Kinetiken	71
3.3.3.1O	Kinetik der Colicin M Wirkung	72
3.3.3.11	Kinetik der Colicin B Wirkung	74
3.3.3.12	Enzymimmunassay mit gelelektrophoretisch isolierten Proteinen der OM	76
4.	DISKUSSION	79
4.1	Antikörper der Zellinie D24	79
4.2	Antikörper der Zellinie LP14	82
4.3	Antikörper der Zellinie AJ214	86
5.	ZUSAMMENFASSUNG	92
6.	LITERATURVERZEICHNIS	93

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Amino-di(3-ethyl-benzthiazolin Sulfonsäure-6) Ammoniumsalz
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
d.	dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
E_x	Extinktion bei x nm
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immonosorbent assay
ention.	entionisiert
FCS	Fötales Kälberserum
FLP	freies Lipoprotein
g	Erdbeschleunigung
IgG	Immunglobulin
k	Kilo...
K_{ads}	Adsorptionskonstante
K-a-M	Kanninchen-anti-Maus
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonale Antikörper
Min.	Minute(n)
MLP	Murein gebundenes Lipoprotein
OD	optische Dichte
OM	äußere Membran
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBS-Triton	PBS mit 0,1 % Triton X-100
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. EINLEITUNG

Escherichia coli ist das bestuntersuchte Bakterium. Von Escherichia coli K-12,dem am häufigsten in wissenschaftlichen Labors anzutreffenden Stamm,sind bereits ein Fünftel des gesamten Genoms d.h. mehr als Tausend Gene kartiert(1). Von 160 Genen sind eindeutig die zugehörigen Genprodukte bestimmt worden(2).

Es ist ein stäbchenförmiger Gram-negativer Keim mit einer Länge von 2-5µm und einen Durchmesser von ca. 0,8µm. Für die Stäbchenform ist der Mureinsacculus verantwortlich,der die Cytoplasma-Membran umgibt. Das Bakterium besitzt noch eine äußere Membran. Der Raum zwischen Cytoplasmamembran und äußere Membran wird als periplasmatischer Raum bezeichnet(3).

Escherichia coli ist ein ständiger,wenn auch geringer(weniger als 1%) Bestandteil der menschlichen Darmflora. Es ist auch in der Darmflora vieler anderer Spezies enthalten. Obwohl das Bakterium im Darm meist harmlos ist,sind einige enteropathogene Escherichia coli Stämme für Diarrhoe-Erkrankungen verantwortlich (Durchfallerkrankungen bei Kleinkinder).
Escherichia coli-Stämme sind verantwortlich für viele Lebensmittelvergiftungen und die meisten menschlichen Harntraktinfektionen. Bekannt sind noch Diarrhoen bei Ferkeln durch Escherichia coli K88 und bei Kälbern durch Escherichia coli K99 (4). Diese Diarrhoen verlaufen meistens tödlich und sind sehr negativ für die Wirtschaftsbilanz der Viehzüchter.

Die Gründe für die Beliebtheit von Escherichia coli in wissenschaftlichen Labors sind auf einer anderen Ebene zu finden. Die leichte Kultivierung der nicht-pathogenen K12 Stämme und die kurze Generationszeit von 20 Minuten haben dazu beigetragen. Hinzu kommt die schnelle Ausprägung von genetischen Mutationen durch die kurze Generationszeit und die Möglichkeit der Klonierung von Genen anderer Organismen. So

wurde Escherichia coli auch ein bedeutendes "Werkzeug" in den Händen der Genetiker.

Auch für die Membranforschung ist das Bakterium sehr interessant. Bakterien sind einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt,die physikalischer,chemischer und biologischer Natur sind. Die Zelle muß die Veränderungen des Biotops erkennen und sich den neuen Bedingungen anpassen. Hier tritt die Bedeutung der äußeren Membran von Escherichia coli in den Vordergrund. Stoffe müssen in die Zelle transportiert werden,andere ins Außenmedium ausgeschleust werden. Die äussere Membran ist die Hülle des Bakteriums,die Kontaktstelle der Zelle mit der Umwelt. Die Bedeutung der äußeren Membran gewinnt aber erst in dem Komplex: Cytoplasmamembran/Mureinsacculus und Periplasma/äußere Membran ihre richtige Dimension.

Die Cytoplasmamembran ist wie die Plasmamembran eukaryotischer Zellen aufgebaut. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen. In dieser Membran sind die Prozesse der oxidativen Phosphorylierung,des aktiven Transports und die Biosynthese bestimmter Moleküle wie der Phospholipide, des Lipopolysaccharids,des Mureins und der Kapselpolysaccharide lokalisiert. Je nach Nährstoffangebot und anderen äußeren Einflüssen ändert sich die Proteinzusammensetzung der Cytoplasmamembran.

Das Murein ist ein Makromolekül aus Zuckerketten,dessen Untereinheiten durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Es dient als Widerlager gegen den auf die Cytoplasmamembran von innen ausgeübten osmotischen Druck von mehreren Atmosphären. Das Murein ist bei Escherichia coli und den anderen Gram-negativen Bakterien einschichtig. Bei den Grampositiven Bakterien besteht die Zellwand aus mehrschichtigem Murein und enthält in der Regel nur wenige Proteine.

Bei Escherichia coli wie auch bei einigen anderen Gram-negativen Bakterien ist die äußere Membran über das Lipoprotein mit dem Mureinsacculus verankert(5). Die äußere Membran ist für die Gram-negativen Zellen eine zusätzliche Permeations-

barriere und Schutz gegen osmotische Veränderungen.

Der Periplasmatische Raum enthält einige hydrolytische Enzyme,Bindeproteine von Transportsystemen und spielt in der Chemotaxis eine Rolle.

Die äußere Membran ist wie die Cytoplasmamembran aufgebaut, enthält aber wesentlich mehr Proteine,die sechzig Gewichtsprozent dieser Membran ausmachen. Auf der Außenseite der Membran,verankert in der äußeren Doppelschicht,sitzen die Lipopolysaccharid-Moleküle(LPS). Ihre O-spezifische Zuckerketten geben den Serotyp des Bakteriums an.

Die hydrophilen Zuckerketten der LPS-Moleküle erschweren den Durchtritt von hydrophoben Molekülen durch die äußere Membran. Der Durchtritt von hydrophilen Stoffen wird durch die Lipidschicht der Membran verhindert. Substanzen,die nicht größer als 600 Dalton (z.B. Saccharide und Oligopeptide) sind,können die Membran durch die Porine passieren(6).

Die beiden Porine OmpF(Ia) und OmpC(Ib) gehören zu den Hauptproteinen der äußeren Membran von Escherichia coli und kommen in einer Kopienzahl von mehr als 100.000 pro Zelle vor(7,8). Die beiden Proteine bilden Trimere(9). Das Porin PhoE wird unter bestimmten Bedingungen von der Zelle gemacht(3),dient als Pore zur erleichterten Diffusion von Phosphaten und als Rezeptor für die Phagen TC45. OmpF wird von den Phagen TuIa, T2 und TP1 als Rezeptor benutzt,während OmpC als Rezeptor für die Phagen 434,TuIb,MeI und PA2 dient(10). Es konnte eine Verwandtschaft der Strukturen dieser drei Porine gezeigt werden(11).

Das OmpA(II) ist ebenfalls ein Hauptprotein der äußeren Membran. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Konjugation der Zellen(12) und idt Rezeptor für die Phagen TuII und K3.

Das bereits erwähnte Lipoprotein ist das häufigste Protein der äußeren Membran(13,14). Pro Zelle sind ca. 250.000 Moleküle über ihr C-terminales Ende an das Murein gebunden(15). Die Zellhülle enthält noch etwa die doppelte Menge an freiem

Lipoprotein. Lipoprotein kommt auch in Serratia,Salmonella, Shigella und in modifizierter Form in Proteus und Pseudomonas vor(16). Vom Lipoprotein sind bis heute keine Rezeptorfunktionen bekannt,es wurde aber festgestellt,daß es mitogen auf B-Lymphozyten wirkt(17,18). Viele Fragen über die Biosynthese des Moleküls und sein Transport in die äußere Membran wurden in der letzten Zeit aufgeklärt(19).

Die äußere Membran enthält noch eine Vielzahl anderer Proteine,denen ganz spezifische Funktionen zugeordnet werden. Ihre Häufigkeit liegt bei einigen hundert bis über zehntausend Moleküle pro Zelle(3,20,21). Ein wichtiges Problem für die Bakterienzelle ist die Versorgung mit Eisen(III). Das Bakterium benötigt zum Wachstum eine Konzentration von 10^{-7}M Eisen(III) Kationen. Unter aeroben Bedingungen bei pH 7 beträgt aber die Konzentration an freiem Eisen(III) Kationen nur 10^{-18}M (22).
Wichtig ist dieser Aspekt für pathogene Keime,die bei der Eisenaufnahme in Konkurrenz mit der Wirtszelle treten. Dieses Problem hat die Zelle durch Rezeptoren für hochaffine Eisenkomplexbildner gelöst. Diese Eisenkomplexbildner werden entweder von Escherichia coli selbst synthetisiert wie Enterochelin oder von anderen Organismen wie Citrat,Ferrichrom oder Rhodothorulasäure. Bei pathogenen Stämmen wurde vor kurzem Aerobactin als verwertbares Siderophor nachgewiesen (23,24). Die Gene für dieses Eisenaufnahmesystem sitzen auf dem Plasmid ColV,das auch für die Pathogemität verantwortlich ist.

Das FhuA-Protein ist Rezeptor für die Phagen T5,T1,Ø80, für Colicin M und das Antibiotikum Albomycin(20). Zusammen mit den anderen Produkten des fhu-Genbereichs,der kloniert wurde (25),ist es notwendig für die Eisenversorgung über Ferrichrom. FhuA ist 78 kd groß und es ist bemerkenswert,wie dieses Protein die Aufnahme von so vielen Substanzen durch die äußere Membran ermöglicht.

Das FecA-Protein ist bei der Aufnahme des Eisencitratkomplexes in die Zelle beteiligt(26). Über das FepA-Protein ge-

langt Eisen(III)-Enterochelin in die Zelle und auch Colicin B (27,28).

Das Tsx-Protein dient der Aufnahme von Nukleosiden und ist Rezeptor für den Phagen T6 und das Colicin K (29,30). Das LamB-Protein ist Rezeptor für den Phagen λ(31) und erleichtert die Aufnahme von Maltose und Maltodextrinen.

Die äußere Membran von Escherichia coli stellt also mit ihren in Bau und Funktion gut bekannten Komponenten ein zugängliches System für Untersuchungen dar. Hinzu kommt der Vorteil gezielter Beeinflussung durch genetische Methoden. Dieses System kann benutzt werden,um Fragen über Struktur und Funktion von Membranproteinen,Translokation von Proteinen durch Membranen und Funktion von Membranporen aufzuklären.

Während die Funktion vieler Rezeptoren bekannt ist,ist ihre Organisation in der Membran,ihre Wechselwirkungen und die Lokalisation der einzelnen Funktionen bei multifunktionalen Rezeptoren wenig untersucht. Es wurden Untersuchungen an Membranproteinen mit Hilfe polyklonaler Kaninchenseren durchgeführt. Probleme dieser Untersuchungen (32,33,34) waren die fehlende Monospezifität dieser Antikörper und die Unterschiede in ihrer Reaktion mit der nativen und denaturierten Form der Proteine.

Mit Entwicklung der Technik zur Produktion von monoklonalen Antikörper(35) wurden auch für dieses Gebiet neue Möglichkeiten geschaffen. Man fusioniert Myelomazellen mit Milzzellen einer immunisierten Maus(36). Der aus der Hybridzelle entstandene Klon (nach der Subklonierung) produziert dann identische Antikörper,die dieselbe Determinante (3-6 Aminosäuren) eines Antigens erkennen. Die Vorteile dieser Methode sind also die Gewinnung größerer Mengen monospezifischer Antikörper (besonders nach der Isolierung mit Protein A-Sepharose, 37) und die Möglichkeit der Immunisierung mit einem Antigengemisch. Die Technik hat inzwischen eine breite Anwendung in der Biologie und Medizin gefunden bis hin zur Krebstherapie(38) und der Herstellung monoklonaler Antikörper mit zwei Antigenspezifitäten(39).

Monoklonale Antikörper wurden auch in der Mikrobiologie gegen bakterielle Antigene eingesetzt,wie einige in der letzten Zeit veröffentlichte Arbeiten zeigen(40-46).

Ziel der Arbeit war es,monoklonale Antikörper gegen äußere Membran-Proteine zu gewinnen,insbesonders gegen das FhuA und Lipoprotein. Es war beabsichtigt,mit diesen Antikörpern Struktur-, und Funktions-Untersuchungen der Rezeptoren auf der Membran lebender Bakterien anzustellen. Mit diesen Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Membran-, und Rezeptor-Topologie gezogen werden.

Zu dieser Thematik gehörte die Entwicklung eines schnellen Tests zur Bestimmung der Antigenspezifität der Antikörper. Schwierigkeiten ergaben sich aus der Verwendung von äußeren Membranproteinen als Antigen. Diese lassen sich nur schwer und meist nur unter denaturierenden Bedingungen isolieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in analysenreiner Qualität bezogen.

Amersham	$^{55}FeCl_3$ in 0,1 M HCl(0,4 mCi/ml,7ug Fe/ml)
Behringwerke	Antiserum gegen Maus-Gammaglobulin von Kanninchen
	Freund´sches Adjuvans komplett
	Freund´sches Adjuvans inkomplett
Boehringer	Deoxyribonuclease
Difco	Bacto-Agar
	Bacto-Trypton
	Hefe-Extrakt
	Nutrient Broth
Gibco	Penicillin/Streptomycin-Lösung(10.000E/ml)
	RPMI-1640-Medium mit Glutamin und Natriumhydrogencarbonat(1x)
	RPMI-1640-Medium,10x konzentriert
	Hanks´s B.S.S(1x)-Puffer(ohne Phenolrot)
Hoffmann LaRoche	"Fluram"(Fluorescamin)
Paesel	Fötales Kälberserum (HY-Clone)
Pharmacia	Protein A-Sepharose CL-4B
Research Products	Agarose(High Celling Temperature)
Serva	Acrylamid
	Ammoniumpersulfat
	Bisacrylamid
	Bromphenolblau
	Coomassie Brilliant Blau G-250
	Dulbecco-s Phosphat-gepufferte Saline(PBS)
	Fluoresceindiacetat
	Hypoxanthin
	ß-Mercaptoethanol
	Natriumdodecylsulfat(SDS)
	Rinderserumalbumin(BSA)
	N,N,N´,N´-Tetraethylendiamin(TEMED)
	Thymidin
	Triton X-100
Sigma	Aminopterin
	Glutaraldehyd

2.1.2 Zellkulturmaterial

Becton Dickinson	Falcon-Gewebekulturflaschen, Wachstumsfläche 25 cm^2 und 75 cm^2 Gewebekulturplatten (96 Einzelkulturen)
Costar	Gewebekulturplatten (24 Einzelkulturen)
Cooke	Flexible V-Mikrotiterplatten aus Polyvinylchlorid

2.1.3 Puffer und Medien

2.1.3.1 Puffer

Dulbecco´s Phosphat-gepufferte Saline:

8,0 g Natriumchlorid
0,2 g Kaliumchlorid
0,1 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
0,1 g Calciumchlorid, wasserfrei
1,0 g di-Natriumhydrogenphosphat
0,15 g Natriumdihydrogenphosphat
0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat

auf 1000ml bidest. Wasser, der pH-Wert des Puffers war 7,2

M9-Salzlösung:

60 g di-Natriumhydrogenphosphat
30 g Kaliumdihydrogenphosphat
5 g Natriumchlorid
10 g Ammoniumchlorid

auf 1000ml ention. Wasser

Adsorptionspuffer:

10% M9-Salzlösung
1 mM Magnesiumsulfat
0,5 mM Calciumchlorid
0,01% Triton X-100

2.1.3.2 Medien

TY-Medium: 8 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
5 g Natriumchlorid
auf 1000ml ention. Wasser

Zur Anzucht des Stammes H0831 wurden 50ug Neomycin/ml zugesetzt.

NB-Medium: 8 g Nutrient Broth
5 g Natriumchlorid
auf 1000ml ention. Wasser

M9-Medium: 10 % M9-Salzlösung

1	mM	Magnesiumsulfat
1	µg/ml	Thiamin
100	µg/ml	Tryptophan,Tyrosin,Phenylalanin
40	µg/ml	p-Hydroxybenzoesäure, p-Aminobenzoe--säure
0,4	%	Glukose
1	µM	Eisen(III)chlorid

Zur Herstellung von Platten wurden 15g Bacto-Agar pro 1000ml, zur Herstellung von Top-Agar 6,5g Agar pro 1000ml zugesetzt.

2.1.3.3 Zellkulturmedien

Normalmedium: 450ml RPMI-1640-Medium(1x)
50ml Fötales Kälberserum
5ml Penicillin/Streptomycinlösung
5ml 0,1M Natriumpyruvat
5ml 25% Glukose
0,5ml $5x10^{-2}$ M ß-Mercaptoethanol

0,5%-Agarose-Medium:

Für 100ml:		
50,0	ml	1% Agarose in bidest.Wasser
32,9	ml	RPMI-1640-Medium (1x)
5,5	ml	RPMI-1640-Medium (10x)
10,0	ml	Fötales Kälberserum
1,0	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
0,1	ml	$5x10^{-2}$ M ß-Mercaptoethanol
0,5	ml	l-Glutaminlösung (30mg/ml)
1,0	ml	Natriumhydrogencarbonatlösung (100mg/ml)

HAT-Medium,HT-Medium(47,48):

Folgende zwei Stammlösungen wurden vorbereitet:

Stammlösung A: 136,1mg Hypoxanthin(MG 136,1) und 38,7mg Thymidin(MG 242,2) wurden zu 100ml ention.Wasser gegeben und 1 Std. auf 45-50°C zur Lösung erhitzt.

Stammlösung B: 1,76mg Aminopterin(MG 440,4) wurden zu 90ml ention.Wasser gegeben.Zur Lösung wurden 0,5ml 1N NaOH zugesetzt,mit 0,5ml 1N HCl wurde neutralisiert und mit ention.Wasser auf 100ml aufgefüllt. Die Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

Für 500ml HAT-Medium:

385	ml	RPMI-1640-Medium(1x)
100	ml	Fötales Kälberserum
5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung

5 ml Stammlösung A
5 ml Stammlösung B

HT-Medium: Wie HAT-Medium ohne Stammlösung B.

2.1.4 ORGANISMEN

2.1.4.1 Bakterien

Folgende Escherichia coli K-12 Stämme:

W 3110	(31)	Wildtyp
AB 2847	(86)	aroB thi malT tsx
H 315	(315)	aroB thi malT tsx ompC 434^r
JW 030	(323)	aroB thi fepA cir ompC ompF $phoE^c$
72-6	(395)	malT thi fhuA ompF glpT glpR relA phoA $T2^r$
HO 831	(831)	thr aro leu pro lac gal arg xyl rpsL thi $TuIa^r$ $TuIb^r$ $TuII^r$ trägt das Plasmid pHK 232($fhuA^+$ $ponB^+$ $Neomycin^r$, aufgrung eines Gendosis-Effekts Überproduktion von FhuA)
1024	(1024)	abgeleitet von W 3110, fhuA 468::Tn10
H 1426	(1426)	aroB tsx lac rpsL zje::Tn10 fur 79
JE 5512	(582)	man lpm pps
JE 5513	(583)	wie JE 5512 aber lpp-2

außerdem wurde der Stamm Escherichia coli BS-1 verwendet(11).

Die Zahlen im Klammern geben,die Nummer in der Stammessammlung des Lehrstuhls Mikrobiologie II an.

2.1.4.2 Bakteriophagen

Die Bakteriophagen T1,T2,T5(Weidel),T6,Ø80,BF23,TuIb stammten aus der Sammlung des Lehrstuhls Mikrobiologie II.

2.1.4.3 Zellinie

Es wurde die Zellinie:

P3-NS1-1-Ag4-1 (NS 1) eingesetzt
ein Abkömmling der P3-X63-Ag4-Zellinie.
Es handelt sich um eine Zellinie,die aus Balb/c-Mäusen stammt. Sie ist 8-Azaguanin-resistent,ihr fehlt die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und sie produziert nur die leichten Kappa-Ketten der Gammaglobulinen,die nicht in das Medium abgegeben werden. Die Zellinie wächst bei einer Zelldichte von 2-5 x 10^5 Zellen/ml logarithmisch.

Die Zellinie wurde von der Abteilung Klein des MPI für Biologie,Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.1.4.4 Mäuse

Die verwendeten Balb/c-Mäuse wurden von der Firma Ivanovas(Kißlegg) bezogen.

2.2 METHODEN

2.2.1 Äthanolfällung

Konzentrierung von Proteinlösungen durch Äthanolfällung. Der Proteinlösung wurde soviel kaltes Äthanol (-20°C) zugegeben, daß die Endkonzentration an Äthanol 80% (v/v) betrug. Es wurde 18 Std. bei -20°C inkubiert, anschließend mit 3000xg abzentrifugiert, und das Präzipitat einmal mit kaltem Äthanol gewaschen. Der Niederschlag wurde in dem geeigneten Puffer aufgenommen. Eine bessere Löschlichkeit der Proteine wurde durch beschallen der Probe 5 Min. im Ultraschallbad erreicht.

2.2.2 Acetonfällung

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen und Abtrennung von Detergenzien wurde eine Acetonfällung durchgeführt.
Ein bestimmtes Volumen der Proteinlösung wurde mit dem vierfachen Volumen an kaltem Aceton (4°C) versetzt und 2 Std. bei -20°C ausgefällt. Es wurde abzentrifugiert (3000xg, 10 Min., 4°C), einmal mit kaltem Aceton gewaschen und der Niederschlag in PBS zur erwünschten Konzentration aufgenommen. Um eine bessere Löschlichkeit zu bekommen, wurde die Lösung 5 Min. lang im Ultraschallbad beschallt.

2.2.3 Protein-Bestimmung mit der Fluram-Methode (49)

Primäre Amine reagieren mit "Fluram". Das Reaktionsprodukt fluoresziert. Die Fluoreszenz wurde mit einem Photometer mit Fluoreszenzzusatz gemessen. Für die Anregungswellenlänge wurde ein Filter mit der Durchlässigkeit von 406-434nm verwendet. Das Anregungslicht wurde zur Fluoreszenzmessung mit einem Filter 470-3000nm ausgefiltert.
Die einzelnen Proben wurden mit Boratpuffer (0,2M, pH 9,0) auf 1,5ml aufgefüllt. Unter Schütteln wurden 0,5ml einer Fluram-Lösung (3mg/10ml Dioxan) zugegeben. 20 Min. nach der Zugabe

wurde die scheinbare Transmission (Fluoreszenz) am Photometer gemessen. Eine Eichkurve wurde mit BSA hergestellt (5,10,20, 30,50 ul einer 1mg/ml BSA-Lösung in ention. Wasser).

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (50,51)

Proteine aus Lösungen und Membranfraktionen wurden mit diskontinuierlicher NaDS-Slab-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Folgende Stammlösungen wurden vorbereitet:

Lösung A: 44g Acrylamid
0,8g Bisacrylamid
mit bidest. Wasser auf 100ml aufgefüllt

Lösung B: 30g Acrylamid
0,8g Bisacrylamid
mit bidest. Wasser auf 100ml aufgefüllt

Trenngelpuffer: 0,75 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8

Das Trenngel wurde auf folgende Weise hergestellt:

6,25	ml	Lösung A
5,12	ml	bidest. Wasser
12,5	ml	Trenngelpuffer
0,62	ml	Ammoniumpersulfat(10mg/ml)
0,5	ml	10% SDS

Die Lösung wurde gut entlüftet und die Polymerisation durch Zugabe von 0,05ml TEMED eingeleitet.

Auf das polymerisierte Trenngel wurde das Sammelgel gegeben, das auf folgende Weise vorbereitet wurde:

2,5	ml	Lösung B
9,13	ml	bidest. Wasser
12,5	ml	Sammelgelpuffer
0,62	ml	Ammoniumpersulfat (10mg/ml)
0,25	ml	10% SDS

Die Lösung wurde gut entlüftet und die Polymerisation durch Zugabe von 0,05ml TEMED eingeleitet.

Die Gele wurden über Nacht bei $4^{o}C$ gelagert und mit einer

konstanten Stromstärke von 12,5 mA/cm^2 gefahren.
Als Elektrodenpuffer wurde 0,025 M Tris
0,1925M Glycin
0,1 % SDS
verwendet. Dieser Puffer hatte einen pH-Wert von 8,3.

Die Proteinproben wurden in folgendem Puffer aufgetragen:

0,2 ml Puffer (0,625 Tris/HCl pH 6,8)
0,4 ml 50 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblaulösung
0,4 ml 10 % SDS
0,1 ml Mercaptoäthanol

Zu diesem Puffer gibt man 0,9 ml der Proteinlösung. Das Gemisch wurde 3-5 Min. auf 100°C erhitzt.

2.2.5 Präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurde das präparative Gel-Elektrophorese System von Bethesda Res. Laboratories Inc.GmbH benutzt.
Es wurde ein rundes 11 prozentiges Gel (2.2.4) gegossen. Die Länge des Gels betrug 5cm und der Durchmesser 1cm. Die OM-Fraktion wurde vorher mit Auftragspuffer 5 Min. bei 70°C solubilisiert. Das Gel wurde mit 4,5mA gefahren. Als die Frontlinie den unteren Teil des Gels erreichte,wurde angefangen mittels eines Fraktionssammlers und einer vorgeschalteten Pumpe die Banden zu sammeln. Die Schläuche wurden so kurz wie möglich gewählt,damit sich die getrennten Proteine nicht wieder mischen. Das Fraktionsvolumen betrug 0,5ml,die Durchflußgeschwindigkeit 0,3ml/Min. Als Elutionspuffer wurde der Elektrodenpuffer (2.2.4) benutzt.
Von jeder 5. Fraktion wurde ein analytisches Gel (PAGE, 2.2.4) gefahren. Bereits nach ca. 80 Fraktionen waren alle Proteine der OM-Präparation aus dem Gel unten rausgekommen.

2.2.6 Anfärben von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden in einer Coomassie Brilliant Blue-Lösung (1,25g Coomassie Brilliant Blue-G-250 von der Fa. Serva in

450ml 50% Methanol und 50ml Eisessig) gelegt. Nach 3-4 Std. begann die Entfärbung durch Einlegen der Gele in die Entfärbe-Lösung (75ml Eisessig, 50ml Methanol mit ention. Wasser auf 1000ml aufgefüllt) über Nacht.

2.2.7 Elution der Banden aus den Gelen und ausfällen vom SDS (52)

Die Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit 100ul 1% SDS bei 60°C über Nacht eluiert.
Um das SDS der Proben auszufällen wurden sie mit dem selben Volumen eines 0,2 M Kaliumphosphatpuffers pH 7,4 versetzt. Nach 30 Min. (RT) wurde das Detergenz mit 7000xg, 4 Min. bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde für das Beschichten der ELISA-Platten benutzt.

2.2.8 Anzucht der Bakterien

Mit Einzelkolonien von Platten des jeweiligen Stammes wurden die Vorkulturen angeimpft und bei 37°C unter Schütteln und guter Belüftung über Nacht angezüchtet. Mit diesen Vorkulturen (stationäre Phase) wurden die Hauptkulturen angeimpft(so daß das Volumen der Vorkultur ca. 1% des Endvolumens entsprach) und das Wachstum durch Messen der optischen Dichte bei 578nm mit einem Eppendorf-Photometer verfolgt.
Eine OD_{578} von 0,1 entspricht einer Bakteriendichte von 10^8 Bakterien/ml Medium. In der Regel wurden die Kulturen bei einer OD_{578} von 0,5 geerntet,abzentrifugiert (3000xg, 4°C, 10 Min.) einmal gewaschen und in dem geeigneten Puffer resuspendiert. Gezüchtet wurden die Bakterien in folgenden Geräten: Gyrotory Waterbath Shaker Model G76 und Controlled Environment Incubator Shaker von New Brunswick Scientific.

2.2.9 Herstellung eines Phagenlysats

0,2 ml Indikatorbakterien aus der stationären Phase wurden mit

0,1 ml Phagensuspension (Titer: 1 x 10^7) gemischt. Die Mischung wurde nach 10 Min. Inkubation bei RT mit 2,5 ml TY-Top-Agar gemischt und auf eine TY-Platte (20 ml) gegossen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Top-Agar-Schicht in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit einem Tropfen Chloroform und 1 ml Phagenpuffer gut durchmischt. Durch Zentrifugation (3000xg, 20 Min., 4°C) wurden Zelltrümer und Agar vom Lysat getrennt.

2.2.10 Phagentiterbestimmung

Von der Phagenstammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten mit Adsorptionspuffer angefertigt. 100 ul einer bestimmten Verdünnungsstufe (10^x) wurde mit dem Top-Agar,der Bakterien eines sensitiven Stammes in der stationären Phase enthielt (Indikatorstamm),gemischt und auf TY-Platte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden die Plaques (pfu) ausgezählt und der Phagentiter wie folgt berechnet:
pfu x 10 x 10^x = Phagen/ml

2.2.11 Überprüfung der Sensitivität von Bakterienstämmen gegen Phagen und Colicinen

Der zu überprüfende Bakterienstamm wurde gezüchtet (2.2.8) und mit der Vorkultur wurde TY-Top-Agar beimpft,so daß das Volumen der stationären Animpflösung etwa 3% des Endvolumens entsprach. 2,5 ml dieses TY-Top-Agars wurden auf der Oberfläche einer TY-Platte verteilt. Nach dem erstarren des Top-Agars wurden 5 oder 10 µl der entsprechenden Phagenverdünnung (mit Adsorptionspuffer) oder der entsprechenden Verdünnung der Colicin-Lösung (verdünnt mit PBS-Triton) aufgetropft,bei RT getrocknet und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.12 Bestimmung der T5-Rezeptoraktivität einer Proteinlösung (53)

zu 0,2 ml der Verdünnung werden 0,1 ml der Phagensuspension gegeben, mit Adsorptionspuffer auf 1 ml aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. 0,2 ml davon und 0,2 ml einer Bakteriensuspension (1 ml Übernachtkultur in 10 ml LB-Nährlösung gewaschen und auf einer TY-Platte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde der Assay mit der gleichen Phagensuspension und 0,2 ml Adsorptionspuffer angesetzt.

Berechnung der Rezeptoraktivität:

$$\frac{\text{pfu Kontrollplatte} - \text{pfu Testplatte}}{\text{pfu Kontrollplatte}} \times 100 = \% \text{ inaktiv. pfu}$$

2.2.13 Isolierung der äußeren Membran (54,55)

Die Zellen wurden in 100 ml Medium bis zu einer OD_{578} von 0,5 angezogen und anschließend mit Lösung bei 4°C 10 Min. abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5,0 ml 0,2M Tris pH 8,0 resuspendiert und folgende Lösungen wurden nacheinander dazugegeben:

1 ml 0,2M Tris/HCl, pH 8,0, 1M Sucrose
0,1 ml 10mM EDTA, pH 8,0
0,1 ml Lysozym (2mg/ml)
3,2 ml ention. Wasser

Die Zellösung wurde gut gemischt und bei RT gelassen bis sich Sphäroblasten gebildet hatten (ca. 5-10 Min.). Anschließend wurden 1 ml Lysierungspuffer (50mM Tris pH 8,0, 2% Triton X-100, 10mM $MgCl_2$, pH 8,0) und 0,1 ml DNase (1mg/ml) dazugegeben. Es wurde gut gemischt bis die Lösung klarer wurde. Nach der anschließenden Zentrifugation (1 Std. mit Kühlung bei 4°C) hat man die CM-Fraktion im Sediment erhalten. Das Sediment wurde zwei mal mit Wasser gewaschen um das Triton zu entfernen. Zwischen den Waschzentrifugationen wurde immer 30 Min. mit Kühlung bei 4°C stehengelassen. Die so erhaltene CM-Fraktion wurde in Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.14 Dialyse von Kulturüberständen

Die Überstände der Hybridoma-Zellkulturen wurden dialysiert,um sowohl das überschüssige Eisen als auch das Penicillin und Streptomycin des Kulturmediums zu entfernen.
Es wurde mit einem 50fachen des Dialysevolumens dialysiert. Der Dialysepuffer wurde in Abstand von 12 Std. 4mal gewechselt. Als Dialysepuffer wurde 25mM Tris/HCl, 50mM NaCl, pH 7,5 benutzt. Anschließend wurden die Überstände 30 Min. bei 56°C inaktiviert,in Portionen verteilt und bei -20°C eingefroren.

2.2.15 Züchten der Zellkulturen

Sowohl die NS1 Myeloma-Zellinie als auch die Hybridoma-Zellinien wurden in fertigem RPMI-1640 Medium (2.1.3.3) als Suspensionskulturen gezüchtet. Die Verdünnung der Zellkulturen auf 200.000 Zellen/ml erfolgte durch Abzentrifugation der Zellen bei 220xg (37°C, 10 Min.) und Wiederaufnahme des Zellsediments in frischem RPMI Medium. Das Wachstum erfolgte bei 37°C im CO_2-Brutschrank(5% CO_2-Gehalt).

2.2.16 Titer- und Lebendzellzahl-Bestimmung der Zellkulturen

Titer-Bestimmung:

Der Titer der Zellkulturen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden mehrere 16er Großquadrate ausgezählt,der Mittelwert gebildet und dieser Wert mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Diese Zahl entspricht der Anzahl der Zellen/ml in der Zellkultur.

Lebendzellzahl-Bestimmung (89):

Die Lebendzellzahlbestimmung erfolgte durch Anfärben mit Fluoresceindiacetat (5 µl Stamm-Lösung in 5ml PBS). 40ul der Zellsuspension wurden mit 40µl dieser Färbelösung gemischt. Die le-

benden Zellen fluoreszieren dann unter dem Fluoreszenz-Mikroskop,nicht die abgestorbenen Zellen und die Zelltrümmer. Die Zahl der lebenden Zellen/ml wurde dann,wie oben beschrieben, bestimmt.

2.2.17 Einfrieren der Zellkulturen

In einem Plastikröhrchen mit Schraubverschluß (2ml Volumen Fa. Greiner) wurden pipettiert: 100µl DMSO
300µl FCS
und der Inhalt auf 4°C abgekühlt. Von der Zellkultur wurde der Zelltiter bestimmt,die Zellkultur abzentrifugiert (220xg, 37°C, 10 Min.), einmal mit fertigem RPMI gewaschen und das Zellsediment in RPMI aufgenommen,daß in 600µl dieser Zellsuspension $6x10^6$ Zellen waren. 600µl dieser Zellsuspension wurden dann in das vorbereitete Plastikröhrchen pipettiert. Es wurde zunächst bei -20°C später bei -70°C eingefroren.

2.2.18 Auftauen von Zellkulturen

Der Inhalt eines Einfrier-Röhrchens wurde schnell bei 37°C aufgetaut und in einem 10ml Plastikröhrchen überführt. 10ml RPMI Medium (37°C) wurden langsam (die ersten 5ml in 2 Min.) und unter leichtem Schütteln dazupipettiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert(220xg, 10 Min., RT) und einmal mit RPMI Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde mit RPMI Medium in einer Zelldichte von $5x10^5$ Zellen/ml resuspendiert. Das Wachstum erfolgte wie in 2.2.15 beschrieben.

2.2.19 Immunisierung von Mäusen (56)

Zur Immunisierung wurden 6 bis 12 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in einer mit Äther gesättigten Atmosphäre betäubt (etwa 1 Min. lang). Sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Immunisierung,die ca. 4 Wochen nach

der ersten und 3 Tage vor der Durchführung der Fusion erfolgte, wurden die Mäuse mit 200µl intraperitoneal gespritzt. Die Immunisierungssubstanz wurde wie folgt vorbereitet: 100µl Proteinlösung (80µg eines Proteins oder einer OM-Präparation) wurden zusammen mit 100µl Freund-schen Adjuvans (kompletten für die erste Immunisierung oder inkompletten für die zweite) ultrabeschallt,bis die Mischung eine gelartige Konsistenz hatte.

2.2.20 Isolierung von Peritoneal-Makrophagen (57)

Die Peritoneal-Makrophagen wurden isoliert und als Feeder-Zellen bei den Kulturen nach der Fusion zugegeben.
Eine BALB/c Maus wurde mit Chloroform (gesättigte Atmosphäre) getötet und das Bauchfell wurde freigelegt. Mit Hilfe einer 10ml Spritze wurden 5ml einer 0,34M Sucrose-Lösung(steril) unterhalb der Leber in dem Intraperitonealen Raum gespritzt. Die Flüssigkeit wurde mit der Spritze einigemale aufgesaugt und wieder im Intraperitonealen Raum reingespritzt,dabei wurde mit dem Finger die Bauchhölle massiert.
Die Flüssigkeit wurde anschließend mit -50xg abzentrifugiert und einmal mit RPMI Medium ge-aschen. Es wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. In der mikroskopischen Betrachtung zeigten die Zellen die charakteristische Form der Makrophagen. Die Peritoneal-Makrophagen wurden den Fusionskulturen als Feeder Zellen zugegeben und zwar in einer Zellzahl von $5x10^4$/ml.

2.2.21 Fusion (47,58)

Fusionsmechanismus und Selektion der Hybridzellen

Milzzellen einer immunisierten Maus werden mit Myelomazellen unter Einwirkung von Polyethylenglykol fusioniert. Der Fusionsmechanismus ist nicht genau bekannt,es wird diskutiert,daß das PEG in der Membran der Zellen eindringt und Umstrukturierungen ermöglicht(59). Nach der Fusion entstehen am Anfang Heterokaryons(fusionierte Zellen bei denen die Zellkerne nicht mitein-

ander verschmolzen sind) und später Hybridzellen.
Diese Hybridzellen besitzen in diesem Fall sowohl die Fähigkeit kontinuierlich in Zellkultur zu wachsen (Eigenschaft der Myelomazelle) als auch die Fähigkeit Antikörper zu bilden (Eigenschaft der Milzzelle).
Die Hybridzellen werden durch HAT(2.1.3.3) selektioniert. Das Aminopterin blockiert den Stoffwechselweg,der zu den Desoxyribonukleotiden führt. Für den alternativen Stoffwechselweg wird die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) benötigt. Dieses Enzym fehlt den Myelomazellen,und deshalb sterben sie in diesem Medium ab. Milzzellen können höchstens bis zwei Wochen in Zellkultur überleben. Nur die Hybridzellen(aus Myeloma- und Milzzellen) überleben länger. Dieser Selektionsmechanismus wurde von Littlefield(48) beschrieben.

Durchführung der Fusion

Die Maus wurde drei Tage nach der 2.Immunisierung in einer Chloroform-gesättigten Atmosphäre getötet und die Milz wurde präpariert. Die Milz wurde in eine Petrischale mit 5ml warmem PBS gebracht,vom Fettgewebe befreit und in eine zweite Petrischale mit 5ml PBS gebracht. Mit einer feinen Schere wurde die Milz in ganz kleine Stücke geschnitten. Mit einer langen Pasteurpipette wurden die Gewebestückchen angesaugt und ausgeblasen bis die locker gebundenen Leukozyten der Milz aus dem Gewebe in das PBS ausgetreten waren. Der Inhalt der Petrischale wurde in ein leeres Röhrchen gebracht,sodaß die Gewebestücke sich am Boden absetzten. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues Röhrchen gebracht und mit 100xg bei RT 10 Min. abzentrifugiert. Von dieser Milzsuspension wurde der Titer bestimmt.

Zellen einer NS1 Kultur,die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden,wurden durch Zentrifugation geerntet(220xg, 10 Min.),in PBS gewaschen anschließend in 5ml PBS suspendiert und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

Pro Fusion wurden zwischen 10^7 und 10^8 Milzzellen und 1-2 x 10^7 Myelomazellen eingesetzt. Das Verhältnis Milz- zu Myelomazellen war zwischen 1:1 und 10:1. Die Zellen wurden zusammen in einem

konischen 30ml-Polystyrolröhrchen mit Schraubverschluß(Greiner) abzentrifugiert(5 Min., 100xg, RT). Der Überstand wurde abgesaugt. Zum Sediment wurden unter vorsichtigem Rühren mit der Pipettenspitze 0,5ml Fusionsreagenz(3g PEG-2000, 0,3ml DMSO, 3ml PBS) gegeben. Damit wurde 90 Sek. bei 37°C inkubiert. Dann wurde tropfenweise 10ml 37°C-warme PBS unter leichtem Schütteln zugegeben. Nach Zentrifugation (5 Min., 100xg) wurde zum Zellsediment unter leichtem Rühren mit der Pipette 3,6ml 37°C-warmes HAT-Medium gegeben. Von dieser Suspension wurden jeweils 50ul mit einer Eppendorf-Pipette mit abgeschnittener Spitze auf insgesamt 72 Einzelkulturen verteilt,die jeweils 1ml 37°C warmes HAT-Medium enthielten.
Bei einigen Fusionen wurden Peritoneal-Makrophagen als "feeder"-Zellen eingesetzt. Sie wurden präpariert wie in 2.2.20 beschrieben. Von der vorbereiteten Makrophagen-Suspension wurden am Tag vor der Fusion $3\text{-}5x10^4$ Zellen pro Kultur verteilt und in HAT-Medium bei 37°C gehalten.
3-5 Tage nach der Fusion wurde pro Kultur 1ml frisches HAT-Medium zugegeben. Alle weiteren 3-5 Tage wurde 1ml Medium gewechselt.

2.2.22 Klonierung einer Zellkultur

Heterogene Mischungen einer Hybrid-Zellinie können durch lokalisiertes Einzelzellwachstum getrennt werden.

Weichagar-Methode (60):

Es wurde eine 1% Agarose-Lösung in bidest. Wasser angesetzt und autoklaviert. Diese 1% Agarose-Lösung wurde benutzt,um das 0,5% Agarose-Medium herzustellen(Zusammensetzung: 2.1.3.3). Petrischalen(Ø 9cm) wurden mit 5ml des 0,5% Agarose-Mediums beschichtet.
Von der Zellkultur wurde der Zelltiter bestimmt und Verdünnungen im fertigem RPMI hergestellt. 1ml der entsprechenden Verdünnung wurde mit 1ml 0,5% Agarose-Medium gemischt und diese 2ml wurden auf eine Petrischale,die mit 0,5% Agarose-Medium beschichtet war,verteilt. Zur Verfestigung des Weich-Agars wurden

die Petrischalen 10 Min. bei RT gelassen und anschließend im CO_2-Brutschrank inkubiert. Nach 10-14 Tagen wuchsen aus Einzelzellen makroskopische sichtbare Kulturen heran,die über 1ml Suspensions-Kulturen zu größeren Kulturen herangezogen wurden.

Flüssig-Methode (61,62):

Die Zellen einer Kultur wurden nach der Zellzahlbestimmung (2.2.16) mit Medium so verdünnt,daß in 200ul im Durchschnitt 0,5 Zellen ware. Sie wurden in Mikrotiterplatten verteilt (200µl/Vertiefung). Das RPMI-1640 Medium enthielt 20% FCS und Feeder-Zellen (Milzzellen einer BALB/c Maus) in einer Zellzahl von $5x10^4$/ml. Bei einigen Vertiefungen wuchsen dann einzelne Zellen zu Kolonien heran. Es wurde auch mikroskopisch betrachtet,ob nur eine einzige Zelle herangewachsen war. Die Subklone wurden dann zu größeren Kulturen herangezüchtet.

2.2.23 Ascites Produktion (63)

Eine Möglichkeit höhere Antikörper-Titer zu erzielen(10 bis 100 fache Steigerung) bietet die Anzucht der Myeloma-Zellen als Ascites in der Bauchhöhle von syngenen Mäusen.
4 bis 6 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden mit Pristan vorbehandelt. Pro Maus wurden 0,2ml Pristan intraperitoneal gespritzt. Nach 2 bis 3 Wochen wurden pro Maus 3-5 x 10^6 Zellen(in 0,2ml Volumen) intraperitoneal gespritzt. Je nach Entwicklung des Tumors wurde die Ascitesflüssigkeit nach 2 bis 4 Wochen gewonnen. Die Ascitesflüssigkeit wurde zur Entfernung von Gewebepartikeln und zur Abtrennung von Lipiden bei 5000xg, 20 Min. abzentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht wurde der Überstand bei -20°C eingefroren.

2.2.24 Reinigung von Peroxidase konjugierten Kaninchen anti-Maus IgG

Um die Peroxidase konjugierten Kaninchen anti-Maus IgG(Fa. Miles-Yeda Ltd,Rehovot Israel) von Aktivität gegen E.coli zu rei-

nigen,wurden sie mit E.coli K12 Zellen voradsorbiert. Diese Aktivitäten gegen E.coli Komponenten stören beim ELISA,da die ELISA-Platten mit der OM von E.coli beschichtet wurden. Bakterien des Stammes E.coli K12 AB2847 wurden in TY-Medium bis OD_{578}=1,0 gezüchtet,anschließend zweimal mit PBS gewaschen und auf eine OD von 5 eingeengt. Die Zellen wurden viermal je 30 Sek. ultrabeschallt. Die so behandelten Bakterien wurden im Verhältnis 1:1 mit den Antikörper(POD-Kaninchen-anti-Maus) 4 Std. bei RT inkubiert. Die Bakterienzellen wurden mit der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Antikörper in den vereinigten Überständen wurden im ELISA (2.2.26) als POD-K-a-M eingesetzt.

2.2.25 Isolierung von monoklonalen Antikörper über Protein A-Sepharose (37)

Protein A aus der Zellwand vom Staphylococcus aureus bindet an den Fc-Teil der Immunoglobuline verschiedener Spezies. Folgende Subklassen der Maus-Immunoglobuline binden an Protein-A: IgG2a, IgG2b und IgG3. Die Subklassen IgG1 und IgM binden nur schwach oder nicht ans Protein-A. Damit besteht die Möglichkeit zur Affinitätsreinigung von Maus-Immunoglobulin.
Als Material wurde Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) eingesetzt. 0,6g dieses Materials wurde in PBS gequollen,mehrmals auf der Glasfritte gewaschen und dann in eine Säule gefüllt. Das Bettvolumen der Säule betrug 1,5ml.
1ml gequollenes Material enthält 0,2mg Protein-A und hatte damit eine Bindungskapazität von 20mg Immunoglobulin.
Zur Vorbereitung der Isolierung wurde die Säule mit dem 20-fachen Säulenvolumen PBS mit 0,1% Natriumazid gewaschen. Der Antikörper enthaltende Überstand einer Hybridomazellinie(maximal 300ml) wurde 20 Min. 3000xg abzentrifugiert und der Überstand der Zentrifugation mit 2M Tris-Base auf pH 7,5-8 eingestellt und mit einer Geschwindigkeit von 10ml/Std. bei RT über die Säule gepumpt. Danach wurde die Säule mit dem 20-fachen Säulenvolumen PBS mit 0,1% Natriumazid gewaschen. Die Elution

erfolgte mit 0,1M Essigsäure. Die Fraktionen (0,5ml) wurden sofort mit 2M Tris-Base auf pH 7,5-8 eingestellt. Der Proteingehalt wurde durch Messung der Extinktion bei 280nm (Zeiss-Photometer) an Hand einer Eichkurve abgeschätzt.

2.2.26 Enzymimmunassay (ELISA) (64,65,66)

Das Antigen (Protein, Proteinlösung, LPS oder Bakterien) wird an Polyvinylchlorid-Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech) gebunden. Die freien Bindungsstellen werden mit BSA geblockt. Die zu testenden Antikörper einer Hybridoma Kultur werden an das Antigen gebunden. An diesen Maus Antikörper werden die mit dem Enzym gekoppelten Kaninchen-anti-Maus (oder Ziege-anti-Maus) Antikörper gebunden. Der Farbumsatz einer für das Enzym geeigneten Substrat-Lösung wird optisch oder spektralphotometrisch ausgewertet.
Die Tests wurden mit folgenden Schritten durchgeführt:

a) Beschichtung der PVC-Platten mit dem Antigen

Variante 1: Beschichtung mit Proteinlösungen, LPS, OM-Präparation

Die Platten wurden mit 100µl einer Antigenkonzentration von 0,02mg/ml beschichtet. Die Verdünnungen der Antigenlösungen erfolgte mit Beschichtungspuffer (50mM Carbonatpuffer, pH 9,6). Die Beschichtung erfolgte 18Std. bei RT.

Variante 2: Beschichtung mit ganzen Bakterien (67)
Bakterien wurden in TY-Medium bis zu einer OD_{578}=0,6 gezüchtet und mit PBS zweimal gewaschen. 50µl von einer OD 0,6 wurden pro Vertiefung der Mikrotiterplatte einpipettiert,und die Platte wurde 5 Min. mit 1500xg bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und pro Vertiefung 50µl einer 0,25% Glutaraldehyd-Lösung in PBS einpipettiert und 5 Min. auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abgegossen und dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden pro Vertiefung 200µl einer 1% BSA Lösung mit 0,1% Natriumazid einpipettiert und 3 Std. bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS

gewaschen um Reste von Natriumazid gründlich zu entfernen.

b) Abblocken der freien Bindungsstellen der PVC-Platte

Das Abblocken erfolgte mit 200µl einer 1% BSA(Fa. Serva)-Lösung in PBS, 2 Std. bei RT.

c) Waschen dreimal mit 200µl PBS-Triton

d) Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern

Pro Vertiefung wurden 50µl Überstand einer Hybridoma-Zellinie oder 50µl einer geeigneten Verdünnung (1:100 bis 1:500 mit 50mM Tris/HCl, pH 8,0 verdünnt) einer isolierten Antikörper-Lösung einpipettiert. Zusätzlich wurden pro Vertiefung 50µl eines 50mM Tris/HCl, pH 8,0 Puffers dazugegeben. Die Inkubation erfolgte 3 Std. bei 37°C.

e) Waschen dreimal mit 200µl PBS-Triton

f) Inkubation mit den spezifischen Antikörper gegen Maus IgG die mit dem Enzym gekoppelt waren.

Es wurden K-a-M Antikörper benutzt,die entweder mit Alkalischer Phosphatase oder Peroxidase (2.2.24) gekoppelt waren (Fa. Miles-Yeda Ltd, Rehovot Israel).
100µl der geeigneten Verdünnung (mit PBS-Triton) der Antikörper-Lösung wurden pro Vertiefung einpipettiert. Die Inkubation erfolgte 18 Std. bei RT.

g) Waschen dreimal mit 200µl PBS-Triton

h) Substrat-Zugabe

Variante 1: Substrat für die Alkalische Phosphatase
Die Substrat-Lösung enthielt 1mg p-Nitrophenol-phosphat gelöst in 1ml Diethanolpuffer. Herstellung des Diethanolpuffers: 48,5ml Diethanolamin in 400ml ention.Wasser mit 50mg $MgCl_2 . 6H_2O$, pH 9,8).
100µl von dieser Substrat-Lösung wurden pro Vertiefung einpipettiert.

Variante 2: Substrat für die Peroxidase

Herstellung der Substrat-Lösung: 80mg 5-Aminosalicylsäure wurden in 100ml 50mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 gelöst unter

Erwärmung bei 80°C. Direkt vor der Verwendung wurde zu 9ml dieser Lösung 1ml einer 0,05% H_2O_2-Lösung gegeben. 100µl dieser Substrat-Lösung wurde pro Vertiefung einpipettiert.

i) Auswertung

15 bis 30 Min. nach der Substrat-Zugabe folgte die Auswertung der Ergebnisse. Die Enzymreaktion wurde mit 50µl einer 1N NaOH-Lösung pro Vertiefung gestoppt.
Bei einer positiven Reaktion bekam man eine gelbe Färbung der Substrat-Lösung der alkalischen Phosphatase und eine rotbraune Färbung der Substrat-Lösung der Peroxidase. Die Auswertung erfolgte entweder optisch oder die Extinktionswerte (E_{405} bei der alkalischen Phosphatase, E_{450} bei der Peroxidase) der Vertiefungen wurden mit Hilfe eines Titertek-Gerätes (Fa. Flow) ermittelt.

2.2.27 Subklassen-Bestimmung der Immunglobuline

Die Charakterisierung der Subklassen der monoklonalen Antikörper wurde mit spezifischen Antiseren nach der ELISA-Methode durchgeführt. Dazu wurde das MONO-AB-ID EIA KIT von Zymed Laboratories Inc. San Francisco verwendet. Der Test enthält spezifische Seren (K-a-M) gegen folgende Subklassen der Maus-IgG: IgG(Fc), IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM(Fc) und gegen die leichten Ketten kappa und lambda.
Der Test wurde mit folgenden Inkubationsschritten durchgeführt:

a) 100µl vom Überstand einer Zellkultur oder 100µl der 1:200 Verdünnung(mit Beschichtungspuffer) der isolierten mAK-Lösung.
+ 50ul Beschichtungspuffer
Inkubation: 18 Std. bei RT

b) Waschen zweimal mit PBS

c) Inkubation mit 1% BSA mit 0,1% Natriumazid, 150µl/ Vertiefung, 1 Std. bei 37°C.
(Natriumazid inaktiviert die Peroxidase,die in dem Medium der Überstände enthalten ist)

d) Waschen dreimal mit PBS-Triton

e) Inkubation mit den Subklassen spezifischen K-a-M Seren.
50µl/Vertiefung, Inkubation: 2 Std. bei RT

f) Waschen zweimal mit PBS-Triton

g) Inkubation mit Peroxidase-Ziege-anti-Kaninchen-IgG
50µl/Vertiefung, 18 Std. bei RT.

h) Waschen dreimal mit PBS-Triton

i) Inkubation mit der Substratlösung (1mM ABTS, 0,1M Citrat, pH 4,2, 0,03% H_2O_2)
100µl/Vertiefung

Die Auswertung erfolgte nach 15 bis 30 Min.. Die positiven Vertiefungen zeigten eine grüne Färbung. Als interne negative Kontrolle wurde Kaninchen Serum mitgetestet anstelle der Subklassen spezifischen Kaninchen Seren. Als positive Kontrolle wurden Vertiefungen mit dem Serum einer Maus (1:100 Verdünnung mit Beschichtungspuffer) beschichtet.

2.2.28 Beeinflußung der Phagenadsorption an E.coli K12 durch monoklonale Antikörper

Bakterien eines E.coli K12 Stammes wurden mit der entsprechende Menge mAK inkubiert. Eine bestimmte Anzahl Phagen wurde dazugegeben. In Zeitabständen wurde die Zahl der nicht adsorbierten Phagen im Überstand durch Ausplattierung auf einem Bakterienrasen ermittelt.
In Vorversuchen wurde für jeden untersuchten Phagen die für die Adsorption optimale Bakteriendichte und das Bakterien/Phagen Verhältnis ermittelt. Für den Test war eine 90% Adsorption nach 20 Min. Inkubation geeignet. Die Bakterien wurden bis zu OD 0,5 angezogen.

Variante 1: Mit Überstand einer Zellinie

Die Bakterien wurden abzentrifugiert und das Pellet mit 50µl PBS aufgenommen. 10µl vom Überstand einer Hybridoma Zellinie

wurden dazugegeben und es wurde 1 Std. unter gelegentlichem Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50µl einer geeigneten Phagenverdünnung (mit Adsorptionspuffer) dazugegeben und es wurde bei 37°C inkubiert.

Variante 2: Mit isolierten mAK

Die Bakterien wurden abzentrifugiert und in folgenden drei Parallel Ansätzen resuspendiert: a) 100µl PBS

b) 100µl einer Maus-IgG-Lösung (Fa. Paesel,Frankfurt) in PBS

c) 50µl der mAK-Lösung +50µl PBS

Es wurde unter gelegentlichem Schütteln 45 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden pro Ansatz 10µl der entsprechenden Phagenverdünnung (mit Adsorptionspuffer) pipettiert und bei 37°C inkubiert.

10µl Proben wurden direkt nach der Phagenzugabe und nach 5, 10, 15, 20 und 45 Min. entnommen. Vor jeder Probenentnahme wurden die Eppendorfgefäße gut geschüttelt. Die 10µl wurden sofort mit kaltem PBS verdünnt. Die Bakterien in der letzten Verdünnungsstufe wurden mit der Eppendorfzentrifuge 90 Sek. abzentrifugiert,und die entsprechende µl-Zahl des Überstandes wurde in 6ml TY-Top-Agar zugegeben,der mit dem entsprechenden Indikator-Bakterienstamm beimpft war. 2,5ml vom TY-Top-Agar wurden auf einer TY-Platte ausplattiert und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurde die Anzahl der pfu ermittelt,die bei der 0 Min.-Probe 300-500 betrug.

Die Adsorptionskonstante wurde nach folgender Näherungsformel berechnet (68):

$$K_{ads} = \frac{2,3}{B.t} \log \frac{p_o}{p_t}$$

p = Phagen
B = Bakterien/ml
t = Zeit

Diese Näherung gilt,wenn wesentlich mehr Bakterien als Phagen eingesetzt werden.

2.2.29 Kinetik der Colicin M/Colicin B Wirkung

Colicine sind von bestimmten E.coli Stämmen produzierte Toxine, die auf andere E.coli Stämme wirken. Colicine gelangen über Rezeptoren in die Zelle. Durch Blockierung dieser Rezeptoren mit entsprechenden Antikörpern sollten Zellen vor diesen Toxinen geschützt werden.
In Vorversuchen wurde die Colicin Verdünnung ermittelt,die nach 15 Min. Inkubation die Zellen zu 90% abtötet.
Die Bakterien wurden bis zu OD 0,5 angezogen. Sie wurden mit 3000xg abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen.

Variante 1: Mit Überstand einer Hybridoma Zellinie

Nach dem Waschen wurden 50µl Bakterien einer OD 0,05 (verdünnt mit PBS-Triton) in Eppendorfgefäße pipettiert. 10µl vom Überstand einer Hybridoma Zellinie wurden dazugegeben. Im Parallelansatz wurden 10µl vom Überstand der Myeloma Zellinie NS1 dazugegeben. Es wurde 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde pro Ansatz 30µl PBS-Triton dazupipettiert,um ein Versuchsvolumen von 100µl zu erhalten.

Variante 2: Mit einer Lösung von isolierten mAK

Nach dem Waschen wurden 70µl Bakterien einer OD 0,05 (verdünnt mit PBS-Triton) in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Kinetiken wurden in einem 100µl Volumen durchgeführt und es wurden folgende Parallelansätze angesetzt:

a) 70µl Bakterien(in PBS-Triton) + 20µl einer 1mg/ml BSA-Lösung(in PBS-Triton)

b) 70µl Bakterien(in PBS-Triton) +20µl von der isolierten mAK-Lösung

Es wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden 10µl einer geeigneten Colicin Verdünnung (mit PBS-Triton) dazugegeben und bei 37°C inkubiert. Direkt nach der Colicin-Zugabe und nach 5, 10, 15, und 20 Min. wurden 10µl Proben entnommen (vor jeder Probeabnahme wurden die Ansätze gut geschüttelt) und mit PBS verdünnt. Die Bakterien in der geeigneten Verdünnung wurden auf TY-Platten ausplattiert

und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei dieser Lebendzellzahlbestimmung betrug die Anzahl der Zellen bei der O Min.-Probe zwischen 100-300.

2.2.30 Agglutinationstest mit Bakterien

Bakterien eines Stammes wurden mit Antikörpern,die gegen Bestandteile ihrer Oberfläche gerichtet waren,inkubiert. Mit Hilfe eines zweiten Antikörpers wurden die Bakterien zur Agglutination gebracht.
Bakterien wurden in TY-Medium gezüchtet,zweimal mit PBS gewaschen und mit PBS-Triton auf eine OD 5,0 eingeengt. 10µl davon wurden auf einem Objektträger pipettiert. Es wurden 10µl vom Überstand einer Hybridoma-Zellinie oder eine entsprechende Verdünnung einer isolierten mAK-Lösung dazugegeben und mit der Eppendorfpipettenspitze gerührt. Anschliessend wurden 10µl einer 1:100 Verdünnung (PBS-Triton) eines Antiserums gegen Maus gamma-Globulin (Fa. Behring) dazugegeben und gut gerührt. Mit Hilfe eines Deckglases und eines Ringes aus Vaseline(Ø 17mm) wurde die Flüssigkeit vor dem Austrocknen geschützt. Nach 15 bis 30 Min. erfolgte die Auswertung mit dem Mikroskop (Zeiss 16er und 40er Objektive).

2.2.31 Bestimmung des ^{55}Fe-Ferrichrom Transports (69,70)

Bakterien wurden in M9-Medium bis zu einer OD 0,5 gezüchtet, mit 3000xg abzentrifugiert und einmal mit M9-Medium gewaschen. Anschließend wurden 5ml Bakterien einer OD 0,5 abzentrifugiert und das Sediment in 4ml M9-Medium resuspendiert. Zu den 4ml Bakterien wurde 1ml dialysierten Überstand einer Hybridoma Zellinie dazugegeben und unter Schütteln 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert und in 5ml M9-Salze resuspendiert. Nitrilotriacetat(Endkonzentration: 100µM) und Glukose (Endkonzentration: 0,1%) wurden dazugegeben und 5 Min. bei 37°C unter Schütteln inku-

biert. 10µl einer ^{55}Fe-Ferrichrom-Lösung wurde dazugegeben und der Transport bei 32°C unter Schütteln gemessen.

Die ^{55}Fe-Ferrichrom-Lösung wurde wie folgt vorbereitet: ^{55}Fe (0,127mM) und kaltes Fe ($FeCl_3$-Lösung, 2,5mM) im Verhältnis 1:9 wurden mit einer Desferriferrichrom-Lösung 0,5-1 Std. bei RT inkubiert. Der Transport (Transportvolumen: 5ml) wurde mit 1,0µM Fe und 1,27µM Desferriferrichrom durchgeführt.

Nach der Zugabe der ^{55}Fe-Ferrichrom-Lösung wurden in Zeitabständen von 1, 3, 5, 8, 11 und 14 Min. 0,3ml entnommen über Selectron Filter (Typ BA85: 0,45µm) filtriert und die Filter zweimal mit 4ml 0,1M LiCl gewaschen. Die Filter wurden über Nacht bei 60°C getrocknet. Die Radioaktivität wurde mit 5ml "Rotinszint 11" in einem Szintillationszähler (Mark II, Nuclear Chicago) gemessen.

Der gemessene ^{55}Fe-Ferrichrom Transport wurde in pMol transportiertes Eisen/mg Trockengewicht der Zellen angegeben.

2.2.32 Hämolyse-Test (71)

Erythrozyten,die vorher mit einem Antigen beschichtet wurden, werden (mit Hilfe vom Komplement) mittels Antikörper einer Hybridoma-Zellinie lysiert,falls diese gegen das Antigen gerichtet sind. Der Test dient also zum Nachweis von spezifischen Antikörpern.

Variante 1: Mit OM beschichtete Erythrozyten in Agarose-Schicht

5ml Schafserythrozyten (Fa.Behring) wurden mit 600xg abzentrifugiert und dreimal mit 5ml Saline gewaschen. Das Erythrozyten-Pellet wurde mit 0,2ml einer OM-Präparation des Stammes E.coli K12 H1426 (Fluram-Bestimmung: 2,5mg Protein/ml) aufgenommen und die Beschichtung erfolgte 30 Min. bei 38°C. Nach dem Abzentrifugieren der Erythrozyten wurde das Sediment zweimal mit Saline gewaschen und das Pelletvolumen mit dem 3-fachen Volumen Saline verdünnt.
150µl von diesen beschichteten Erythrozyten wurden mit 5ml 1%

Agarose gemischt und auf eine Agarose-Platte verteilt. Nach dem Erstarren der Agarose-Schicht wurden 10µl vom Überstand einer Hybridoma-Zellinie aufgetropft und 20 Min. bei RT trocknen gelassen. Die Platte wurde anschließend mit 3ml einer Komplement-Lösung (Meerschweinchen-Komplement 1:10 mit Saline verdünnt) überschwemmt. Es folgte 1 Std. Inkubation bei 37°C.

Variante 2: Mit Lipoprotein beschichtete Erythrozyten in Mikrotiterplatte

1ml Schafserythrozyten (Fa.Behring) wurden abzentrifugiert (600xg, 5 Min., RT) und das Pellet zweimal mit 10ml Hank's BSS (1x)-Puffer gewaschen. Die Erythrozyten (Zellsediment nach dem Waschen ca. 0,2ml) wurden mit 1,2ml einer 0,2mg/ml FLP-Lösung (verdünnt mit HBSS-Puffer und mit Ultraschall in Lösung gebracht) aufgenommen gut resuspendiert und die Beschichtung erfolgte 20 Min. bei 38°C. Die beschichteten Erythrozyten wurden abzentrifugiert (600xg, & Min., RT),einmal mit HBSS-Puffer gewaschen und in 10ml HBSS-Puffer gut resuspediert. 0,5ml von dieser beschichteten Erythrozyten-Lösung wurden mit 600xg abzentrifugiert und das Sediment in 2,5ml Meerschweinchen-Komplement aufgenommen.
In Mikrotiterplatten mit rundem Boden wurde pro Vertiefung 100-200µl Überstand einer Hybridoma-Zellinie und 25µl der fertigen Erythrozyten-Lösung(beschichtet in Komplement) gegeben.

Die Mikrotiterplatte wurde bei 37°C inkubiert und nach 30 Min. ausgewertet. In den Vertiefungen bei denen die Erythrozyten lysiert waren,war kein Absetzen der Erythrozyten auf dem Boden der Vertiefungen zu beobachten.

2.2.33 Enzymimmunologischer Nachweis der Spezifität von Antikörpern mit einzelnen Banden einer PAGE

Die OM Proteine einer OM-Präparation des Stammes E.coli K12 H1426 wurden gelelektrophoretisch getrennt.
Um eine bessere Trennung zwischen OmpC und OmpF zu erreichen, wurde die OM-Präparation vorher 10 Min. bei 70°C mit Auftrags-

puffer solubilisiert. Das Gel wurde mit Coomassie-Blue 250 gefärbt und die einzelnen Banden herausgeschnitten. Die identischen Banden aus 5 Spuren wurden mit 350µl 1% SDS über Nacht eluiert und das SDS der Elutionslösung mit Kaliumphosphatpuffer ausgefällt (2.2.7). Nach dem Abzentrifugieren des Detergens wurden die Proteine im Überstand mit Athanol ausgefällt. Das Sediment nach der Äthanolfällung wurde in 500µl Beschichtungspuffer aufgenommen. Mit je 100µl dieser Proteinlösung wurden die Vertiefungen der ELISA-Platten beschichtet. Getestet wurde die Spezifität der isolierten mAK einer Hybridoma-Zellinie mit den Proteinen der einzelnen Banden anhand der unterschiedlichen Extinktionswerten des ELISA.

2.2.34 Immunpräzipitation (72)

Äußere Membran Proteine werden mit mAK (Überstand einer Hybridoma-Zellinie) inkubiert. Je nach Spezifität der Antikörper werden einzelne Proteine ausgefällt.
100µl einer Präparation der OM von E.coli K12 Stamm (0,2mg Protein) wurde mit 100µl SDS-Puffer(2% SDS, 0,1M Tris/HCl, pH 8,0, 2mM EDTA) 5 Min. auf 100°C erhitzt. Die auf diese Weise solubilisierte Membran wurde in 10ml Überstand einer Hybridoma Zellinie (50µg Antikörper) gegeben und 2 Std. unter gelegentlichem Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50µg K-a-M-IgG (Fa.Behring) zugegeben und weitere 3 Std. bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (3000xg, 20 Min.) wurde das Sediment zweimal mit Puffer (0,1% SDS, 0,1M Tris/HCl, pH 8,0, 2mM EDTA) gewaschen, in 10µl Auftragspuffer aufgenommen und 5 Min. auf 100°C erhitzt. Mit den Proben wurde eine SDS-PAGE gefahren. Es wurden folgende Kontrollansätze mitgetestet:

a) Überstand der NS1 Myelomazellinie statt des Hybridoma-Kulturüberstandes
b) Ansatz ohne Membranproteine aber mit Überstand der Hybridoma Zellinie.

3 ERGEBNISSE

3.1 Hybridomazellinie D24

3.1.1 Charakterisierung der angereicherten FhuA-Lösung

Die zur Immunisierung verwendete angereicherte FhuA-Lösung wurde von K.Hantke (73) zur Verfügung gestellt. Eine Proteinbestimmung nach der Fluram-Methode ergab ein Gehalt von 0,4mg Protein/ml.
Die Gelelektrophorese zeigte,daß die Lösung sieben starke Banden aufweist (Abb.1). Es fehlten fast ganz die Hauptproteine und das 83K-Protein. FhuA ist in dieser Lösung stark angereichert.
Um festzustellen,ob die FhuA-Rezeptormoleküle in der angereicherten Lösung aktiv waren,wurde die T5-Inaktivierung bestimmt. Methodisch wurde wie in 2.2.12 beschrieben vorgegangen. Die Bestimmung ergab eine über 95% Inaktivierung der eingesetzten Phagen.

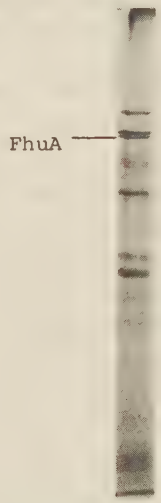


Abb. 1
PAGE-Elektrophorese der angereicherten FhuA-Lösung

3.1.2 Immunisierung

Eine 6 Wochen alte BALB/c Maus wurde mit der angereicherten FhuA-Lösung immunisiert. Die Maus wurde intraperitoneal mit

100µg Protein gespritzt (die FhuA-Lösung wurde vorher durch Aceton-Fällung auf 1mg/ml konzentriert).

3.1.3 Fusion

Als Fusionsreagenz wurde 35% PEG mit 15% DMSO in PBS eingesetzt. Es wurde 90 Sek. bei 37°C inkubiert. Die Zellen der Fusion wurden in 72 Kulturen zu 1,5ml verteilt,davon wuchsen 54 Hybrid-Zellkulturen (Ausbeute 75%).

3.1.4 Screening der Hybrid-Klone mit ELISA

Die 54 Hybrid-Zellkulturen der Fusion wurden mit ELISA(Alkalischer Phosphatase, 2.2.26) getestet. Die ELISA-Platten wurden mit FhuA-Lösung beschichtet (100µl/Vertiefung einer 0,2mg/ml Lösung).
9 Hybrid-Klone waren positiv im Vergleich zu NS1 Überstand (Leerwert). Ihre Extinktionswerte lagen über 0,2.

3.1.5 1.Subklonierung,Screening der Subklone und Subklassen-Bestimmung

Die positiven Hybrid-Klone wurden nach der Weich-Agar Methode subkloniert. Von den Subklonierungen wurden 30 angewachsene Kulturen weitergezüchtet.
Das Screening der Subklone erfolgte wieder durch ELISA(Alkalischer Phosphatase). Im Vergleich zu NS1 Überstand lag der Extinktionswert des positiven Klons D24 über 0,2. Eine Subklassenbestimmung ergab zwei (IgG1, IgGM) Subklassen und als leichte Kette kappa.

3.1.6 2.Subklonierung,Screening der Subklone und Subklassen-Bestimmung

Der Klon D24 wurde ein zweites Mal subkloniert und die Sub-

klone wieder wie oben mit ELISA getestet. Einer der positiven Subklone produzierte nur Antikörper der Subklasse IgG1 mit der leichten Kette kappa. Der Überstand dieses Klons (als Zellinie D24 bezeichnet) wurde für die weiteren Experimente verwendet.

3.1.7 T5-Phagenbindungstest

Der Phage T5 benutzt das FhuA-Rezeptorprotein der OM von E.coli als Rezeptor. Es wurde versucht mit Hilfe der mAK der Zellinie D24 die Adsorption der T5-Phagen an das FhuA zu verhindern.
Die Tests wurden wie in 2.2.28 beschrieben durchgeführt. Bakterien des Stammes AB2847 wurden 1,5 Std. mit Überständen der Zellinie D24 und der Myeloma-Zellinie NS1 (Kontrolle) bei 37°C inkubiert. T5 Phagen wurden zu den Ansätzen dazugegeben (Verhältnis Phagen:Bakterien 1:1000) und nach 45 Min. Inkubation bei 37°C Proben entnommen. Die Zahl der nicht adsorbierten Phagen (pfu) wurde durch Ausplattieren der entsprechenden Verdünnung auf TY-Top-Agar (Indikatorstamm AB2847) bestimmt. Durch Parallelansätze ohne Bakterien wurde die Prozentzahl der adsorbierten Phagen errechnet (Tab. 1).

Tabelle 1: Hemmung der T5 Phagenadsorption durch Antikörper der Zellinie D24

Kultur-Überstand	Zahl der pfu/ Platte	Ø	% Adsorption
NS1 ohne Bakterien	103/112	107	0
NS1 auf AB2847	11/16	13	87,8
D24 ohne Bakterien	98/111	104	0
D24 auf AB2847	45/51	48	46,2

Nach 45 Min. bleiben im Ansatz mit Überstand der D24 4,4 mal mehr Phagen im Überstand als bei der NS1 Kontrolle.

3.1.8 BF23-Phagenbindungstest

Um nachzuweisen,daß die mAK der Zellinie D24 nur die Adsorption der Phagen T5 verhindern und nicht die Adsorption von Phagen die andere Rezeptormoleküle der OM benötigen,wurden auch Phagenbindungstests mit dem Phagen BF23 durchgeführt.
Der Phage BF23 ist ein dem T5 sehr ähnlicher Phage,der aber an das BtuB-Rezeptorprotein der OM von E.coli bindet.

Die Durchführung der BF23-Phagenbindungsteste entsprach der der T5 Tests(3.1.7). Die Vorinkubation mit den Überständen erfolgte 30 Min. bei 37°C. Mit den Phagen wurde 45 Min. bei 37°C inkubiert (Verhältnis Phagen:Bakterien 1:100). Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Bakterien gemacht. Die Resultate aus drei Tests sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Beeinflussung der BF23 Phagenbindung durch den Kulturüberstand der Zellinie D24

Kultur-Überstand	Zahl der pfu/ Platte	Ø	% Adsorption
NS1 ohne Bakterien	560/570	565	0
NS1 auf AB2847	27/25	26	95,4
D24 auf AB2847	29/31	30	94,7

Die Adsorption der BF23 Phagen konnte nicht verhindert werden.

3.1.9 Colicin M-Test

Bakterien wurden mit Überstand der Zellinie D24 inkubiert. Sind die Antikörper gegen das FhuA Rezeptorprotein gerichtet,

verhindern sie die Bindung von Colicin M an den Rezeptor und somit die Abtötung der Bakterien. Die Zahl der überlebenden Bakterien wurde durch Ausplattieren auf TY-Platten ermittelt. Die Tests wurden mit dem Stamm AB2847 wie beschrieben(2.2.29) durchgeführt.
Als Kontrolle wurde der NS1 Überstand mitgetestet,außerdem Ansätze ohne Colicin M. Die Colicin M-Lösung wurde von R.Dreher zur Verfügung gestellt. 10µl der 10^{-5} Verdünnung dieser Lösung aufgetropft auf TY-Top-Agar (Indikatorstamm W3110) ergab noch ein Lysehof. Für den Test wurde die 2,5 x 10^{-6} Verdünnung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 15 Min. bei 37°C.
Die Ergebnisse aus sechs Tests sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Hemmung der Colicin M Wirkung durch Kulturüberstand der Zellinie D24

Kultur-Überstand	Kolonien-Zahl	% im Vergleich zu Proben ohne Colicin
NS1 ohne Colicin	67	100
NS1 mit Colicin	17	25,7
D24 ohne Colicin	72	100
D24 mit Colicin	51	70,2

Es werden 2,7 mal mehr Bakterien mit Kulturüberstand der D24 vor der Colicin M Wirkung gerettet als bei der NS1 Kontrolle.

Überschlagsmäßig ergibt sich als Verhältnis der eingesetzten Antikörpermoleküle zu Rezeptoren folgendes:

$2,5x10^7$ Bakterien(1000 FhuA-Rezeptoren/Zelle): ca $2,5x10^{10}$ Rezeptoren

5µg/ml mAK im Kulturüberstand
d.h. 0,05µg/10ul (MG: 150000 d.) : ca $2,0x10^{11}$ Antikörper

Antikörpermoleküle:Rezeptoren : 10:1

3.1.10 Colicin B-Test

Um die Spezifität der Hemmung der Colicin M Wirkung zu überprüfen,wurde Colicin B benutzt,das an das FepA Protein der OM bindet.
Die Versuchs-Bedingungen, Ansätze und Bakterienstämme sind die selben wie bei Colicin M.
Die Ergebnisse aus vier Tests sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Hemmung der Colicin B Wirkung durch Kulturüberstand der Zellinie D24

Kultur-Überstand	Kolonien-Zahl	% im Vergleich zu Proben ohne Colicin
NS1 ohne Colicin	65,3	100
NS1 mit Colicin	12,3	18,8
D24 ohne Colicin	59,3	100
D24 mit Colicin	11,6	19,6

Eine Rettung der Bakterien von der Colicin B Wirkung mittels mAK der Zellinie D24 konnte nicht nachgewiesen werden. Es überleben genau soviele Bakterien wie bei der NS1 Kontrolle.

3.1.11 Agglutination von Bakterienstämmen

Der Überstand der D24-Zellinie wurde zu einer Bakterien-Kultur gegeben. Die Agglutination wurde mit einem zweiten Antikörper verstärkt und mikroskopisch ausgewertet.
Die Tests wurden wie unter 2.2.30 beschrieben durchgeführt.
Das gelelektrophoretische Bandenmuster der OM der verwendeten Stämme ist in der Abb. 2 zu sehen. Dem Stamm JW 030 fehlen die

Hauptproteine und er besitzt das Ersatzprotein PhoE. Dies Protein ist dem OmpF sehr ähnlich (3).

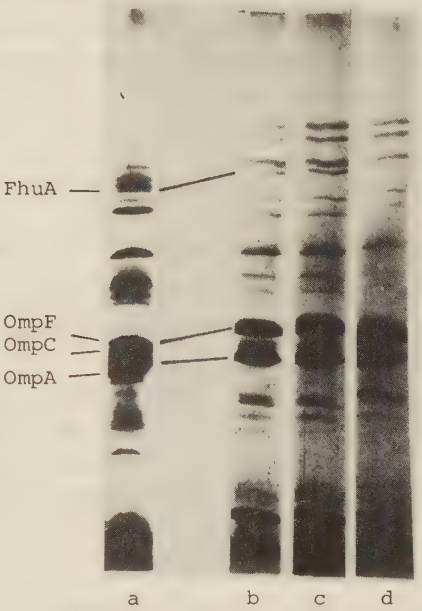


Abb. 2:

SDS-PAGE von Proteine der OM folgender Stämme:
a) AB2847
b) H315, c) JW 030
d) 72-6
Die Membran von AB2847 wurde 5 Min. bei 100°C solubilisiert. Die Membranen der übrigen Stämme 10 Min. bei 70°C.

Die Resultate aus fünf Tests sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Agglutination von Bakterienstämmen mit Kulturüberstand der Zellinie D24

Kultur-Überstand	*E.coli* K12 Stämme			
	AB2847 *fhuA*$^+$ *ompF*$^+$ *ompC*$^+$	H315 *fhuA*$^+$ *ompF*$^+$ *ompC*	JW 030 *fhuA*$^+$ *ompF* *ompC* *phoE*^{c}	72-6 *fhuA* *ompF* *ompC*$^+$
NS1	-	-	-	-
D24	+	+	(+)	-

- keine Agglutination, (+) geringe Agglutination, + gute Agglutination

Mit Bakterienstämmen,die FhuA besitzen,bekommt man eine gute Agglutination. Mit dem Stamm 72-6,der kein FhuA besitzt,bekommt man keine Agglutination. Eine spezifische Bindung der Antikörper an die Hauptproteine OmpC,F,E kann man nach den Ergebnissen der Tab. 5 mit großer Wahrscheinlichkeit ausschliessen.

3.1.12 ELISA-Test (Hauptproteine, FLP, MLP)

ELISA-Platten wurden mit folgenden Lösungen beschichtet:

a) Ein Gemisch aus OmpF und OmpC
   Unter denaturierenden Bedingungen von K.Hantke isoliert.
   Beschichtungskonzentration: 20µg Protein/ml
b) Ein Gemisch aus OmpF und OmpC
   Als native Trimere von U.Henning isoliert.
   Beschichtungskonzentration: 20µg Protein/ml
c) mit FLP (isoliert von S.Mollner), 20µg/ml
d) mit MLP (isoliert von S.Mollner), 20µg/ml

ELISA wurde wie beschrieben (2.2.26) durchgeführt. Getestet wurde der Kulturüberstand der D24 und als negative Kontrolle der Überstand der NS1-Linie. Als positive Kontrolle Serum einer mit H1426 OM-Präparation immunisierten Maus (1:1000 mit Beschichtungspuffer verdünnt) getestet.
Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

a) bei der negativer Kontrolle betrug der Extinktionswert überall 0.
b) bei der positive Kontrolle (H1426 Maus-Serum) lag der Extinktionswert bei allen Proben bei 0,21.
c) der Kulturüberstand der D24 reagierte mit den beiden Hauptprotein-Lösungen und zeigte überall schwache Extinktionswerte,die bei 0,1 lagen.
d) Keine Reaktion des D24 Kulturüberstandes mit FLP und MLP (Extinktionswerte bei allen Vertiefungen: 0).

3.1.13 ELISA-Test (OM von H1426 und LPS)

ELISA-Platten wurden mit verschiedener Konzentrationen einer OM-Präparation des Stammes H1426 und LPS von E.coli K12 (isoliert von K.Hantke,(76)) beschichtet. Es ging um die Frage, ob die Antikörper der Zellinie D24 gegen LPS gerichtet sind. Als negative Kontrolle wurde NS1 Überstand mitgetestet. ELISA wurde wie beschrieben (2.2.26) durchgeführt.
Die Ergebnisse aus drei Tests sind in der Tab. 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Reaktion der D24 Antikörper im ELISA mit OM des Stammes H1426 und LPS von E.coli K12

	LPS von E.coli K12					OM von H1426				
µg/ml	20	2	0,2	0,04	0,008	20	2	0,2	0,04	0,008
NS1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D24	0,02	0,01	0	0	0	0,3	0,2	0,08	0,04	0,02

Extinktion bei 450nm

Bereits bei einer Beschichtungskonzentration der ELISA-Platten mit 2µg/ml LPS zeigen die Antikörper der Zellinie D24 keine Reaktion mehr, während man mit H1426 Membran noch bei einer Beschichtungskonzentration 0,04µg/ml einen Extinktionswert von 0,04 bekommt. Die Antikörper reagieren also nicht mit LPS. Das LPS wurde elektrophoretisch untersucht. Es zeigte sich,daß es zu 1% mit Membranproteinen verunreinigt war.

3.1.14 Hämolyse-Test

Um spezifische Antikörper gegen Komponenten der OM von E.coli im Kulturüberstand der D24 nachzuweisen,wurden diese Hämolyse Tests durchgeführt.
Erythrozyten wurden mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 beschichtet. Die beschichteten Erythrozyten wurden mit 1% Agarose gemischt und auf eine Agarose-Platte verteilt. Mit Hilfe

vom Kulturüberstand der D24 und Komplement kann man eine Hämolyse beobachten, falls die Antikörper gegen Komponenten der OM gerichtet sind.
Die Tests wurden wie beschrieben (2.2.32) durchgeführt.
Als negative Kontrolle wurde NS1 Überstand und als positive Kontrolle Serum einer mit einer H1426 OM-Präparation immunisierten Maus mitgetestet.
Es gab eine schwache Hämolyse mit dem Überstand der Zellinie D24, eine gute Hämolyse der positiven Kontrolle und keine Hämolyse bei der negativer Kontrolle.

3.1.15 Ferrichrom-Eisentransport

Ferrichrom benutzt das FhuA Rezeptorprotein der OM von E.coli um als Carrier Eisen(III) in die E.coli Zelle zu transportieren. Mit diesen Experimenten wurde die Beeinflußung des Ferrichrom-Eisen(III)-Transports in die Zellen des Stammes AB2847 durch dialysierten Kulturüberstand der D24 untersucht.

Die Versuche wurden wie beschrieben (2.2.31) durchgeführt. Folgende Parallelansätze wurden in jedem Test durchgeführt: a)Zellen in PBS, b) Zellen mit Kulturüberstand der NS1, c)Zellen mit Kulturüberstand der D24. Die Kulturüberstände der NS1 und D24 waren vorher dialysiert (2.2.14).
Nach der Inkubation mit den Kulturüberständen und vor der Durchführung des Transports wurde durch Ausplattieren die Zellzahl in den Parallelansätzen bestimmt. Es ergab sich die gleiche Ausgangszellzahl für die Transportversuche bei allen drei Ansätzen.
Es wurden 5ml Zellsuspension (AB2847 OD=0,5) und jeweils 1ml des Zellkulturüberstandes eingesetzt. Die Eisen Konzentration war 1,0µM, die des Ferrichroms 1,27µM.

Aus $1,25x10^{9}$ Bakterien (1000 FhuA-Moleküle/Zelle) mit ca. $1,25x10^{12}$ Rezeptoren und 1ml Kulturüberstand mit 5µg Antikörper (MG 150 000) d.h. ca $2,0x10^{13}$ Antikörpermoleküle ergeben sich 15 Antikörpermoleküle pro 1 Rezeptor.

Die Ergebnisse aus drei Versuchen sind in der Abb. 3 zusammengefaßt.

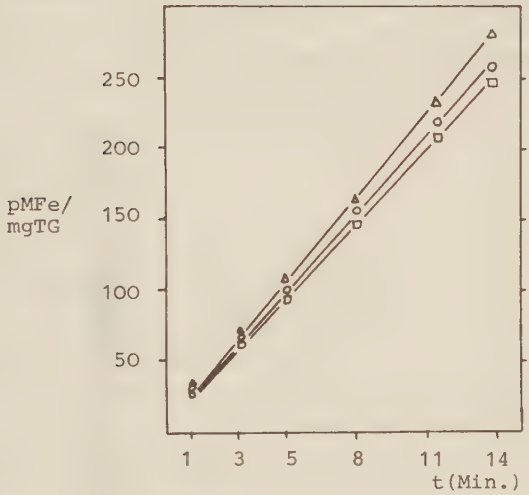


Abb. 3: Beeinflussung des Ferrichrom-Fe-Transports bei E. coli K12 AB2847

△: PBS
□: NS1-Überstand(dialys.)
○: D24-Überstand(dialys.)

Es konnte keine Beeiflussung des Ferrichrom-Fe-Transports durch dialysierten Kulturüberstand der D24 nachgewiesen werden.

3.1.16 Gewinnung von Ascites-Flüssigkeit

Mäusen wurde intraperitoneal Pristan und nach 4 Wochen Zellen der Zellinie D24 gespritzt. Drei Wochen danach wurde die Bauchhöleflüssigkeit (Ascites) der Mäuse entnommen.
Die Ascites-Flüssigkeit wurde wie beschrieben (2.2.23) gewonnen. Durch eine Fluram-Bestimmung wurde der Proteingehalt der Ascites-Flüssigkeit bestimmt. Er lag bei bei 45mg Protein/ml. Im

Vergleich dazu ergab eine Proteinbestimmung des K-a-M-IgG Serums (Behring) einen Proteingehalt von 70mg/ml. Die Ascites-Flüssigkeit wurde gelelektrophoretisch (SDS-PAGE) untersucht. Das Proteinbanden-Muster ist in der Abb. 4 zu sehen. Man erkennt deutlich die schweren (bei 55.000) und die leichten (bei 25.000) Ketten der Antikörper. Sie enthielt auch erheblichen Mengen Albumin und verschiedene andere Proteine.

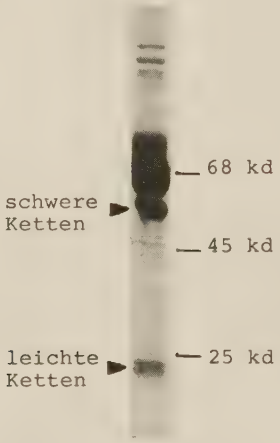


Abb. 4: PAGE der Ascites-Flüssigkeit der Zellinie D24

3.1.17 Colicin M und Colicin B Tests mit Ascites-Flüssigkeit

Es wurde untersucht,ob die Antikörper der Ascites-Flüssigkeit der Zellinie D24 die Abtötung der E.coli AB2847 Zellen durch Colicin M oder Colicin B verhindern können.
Die Tests wurden wie in 3.1.9 und 3.1.10 beschrieben durchgeführt. Bei allen Tests wurde die Ascites-Flüssigkeit 1:10 verdünnt eingesetzt und mit dem NS1-Überstand verglichen.
Er wurden immer Parallelproben mit und ohne Colicin angesetzt. Mit Colicin M wurde 15 Min. und mit Colicin B 25 Min. bei 37°C inkubiert.

Die Ergebnisse aus jeweils drei Tests sind in der Tab. 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Beeinflussung der Colicin M und B Wirkung an den Stamm AB2847 mit Ascites-Flüssigkeit der Zellinie D24

	Colicin M % Überlebende im Vergleich zu den Proben ohne Colicin			Colicin B % Überlebende im Vergleich zu den Proben ohne Colicin		
Test:	I	II	III	I	II	III
NS1	10,9	20,2	22,5	17,6	8,3	3,6
Ascites D24	17,6	37,8	69,8	23,4	12,7	3,5

Durch die Antikörper in der Ascites-Flüssigkeit werden 2-3 mal mehr Zellen von der Colicin M Wirkung gerettet als bei der NS1 Kontrolle (durch Vergleich der % Überlebende der Tab. 7). Deutlich schlechter ist die Rettung (maximal 1,5 mal mehr als bei der NS1 Kontrolle) der Zellen von der Colicin B Wirkung.

Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der gleichen Experimente mit Kulturüberstand der Zellinie D24 (3.1.9 & 3.1.10). Allerdings konnte mittels Ascites-Flüssigkeit kein Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden.

3.2 Hybridomazellinie LP14

3.2.1 Immunisierung und Fusion

Die Mäuse wurden mit FLP (isoliert von E.coli K12 und zur Verfügung gestellt von S.Mollner(74)) immunisiert,um spezifische Antikörper gegen das Lipoprotein zu bekommen. MLP wurde nicht genommen, um die starke Immunantwort der Mäuse zu vermeiden.

Die Immunisierung erfolgte wie beschrieben (2.2.19). Eine 6 Wochen alte Maus wurde mit 80µg (gelöst in PBS) immunisiert. Drei Tage nach der zweiten Immunisierung wurde die Fusion wie beschrieben (2.2.21) durchgeführt. Als Fusionsreagenz wurde 35% PEG mit 15% DMSO in PBS benutzt. Es wurde 90 Sek. bei 37°C inkubiert. Die Zellen der Fusion wurden in 144 Kulturen zu 1,5 ml verteilt; davon wuchsen 140 Hybridomazellkulturen, d.h. die Ausbeute betrug 97%.

3.2.2 Screening der Hybrid-Klone, Subklonierungen, Subklassen-Bestimmung

Die 140 Hybridklone der Fusion wurden mit ELISA (Alkalischer Phosphatase, 2.2.26) getestet. Die ELISA-Platten wurden mit einer 0,2mg/ml (in PBS gelöst) FLP-Lösung beschichtet.
9 Hybridklone waren positiv im Vergleich zu NS1 Kulturüberstand.

Drei von den positiven Hybrid-Klonen wurden nach der Flüssig-Methode subkloniert (2.2.22). Das Screening der Subklone erfolgte wieder durch ELISA. Einige positive Subklone wurden ein zweites Mal subkloniert (Flüssig-Methode). Das Testen der Subklone erfolgte wieder durch ELISA.
Der Kulturüberstand des Subklons LP14 zeigte im ELISA eine positive Reaktion. Eine Subklassen-Bestimmung ergab als Subklasse IgG2a und als leichte Kette kappa. Für die weiteren Experimente wurde Kulturüberstand dieser Zellinie verwendet.

3.2.3 Agglutinations-Test mit E.coli K12-Stämmen

Die Tests wurden wie beschrieben (2.2.30) mit dem Kulturüberstand der Zellinie LP14 und den Stämmen AB2847, 1024, JE5512 und JE5513 durchgeführt.
Die Ergebnisse sind in der Tab. 8 zusammengefaßt.
Der Stamm JE5512 besitzt Lipoprotein,während der Stamm JE5513 frei vom Lipoprotein ist (lpp-2).

Tabelle 8: Agglutination von Bakterienstämmen mit Kultur-Überstand der Zellinie LP14

Kultur-Überstand	E.coli K12-Stämme			
	AB2847	1024 fhuA	JE5512	JE5513 lpp-2
NS1	-	-	-	-
LP14	++	+	+	(+)

- keine Agglutination, (+) geringe Agglutination
+ gute Agglutination, ++ starke Agglutination

Man bekommt eine gute Agglutination mit den Stämmen AB2847 und 1024. Es wurde auch ein deutlicher Unterschied in der Agglutination zwischen den beiden Stämmen JE5512 und JE5513 beobachtet.

3.2.4 Hämolyse-Test

Erythrozyten wurden mit FLP beschichtet. Den beschichteten Erythrozyten wurde Komplement zugegeben. Es wurde untersucht,ob die mAK der Zellinie LP14 in der Lage sind die Erythrozyten zu lysieren. Die Versuche wurden wie beschrieben (2.2.32) durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden beschichtete Erythrozyten mit HBSS-Puffer als auch mit NS1 Kulturüberstand inkubiert. Als Kontrolle für die Lyse der Erythrozyten wurden beschichtete Erythrozyten mit ention.Wasser inkubiert. Ein Kanin-

chen-anti-Lipoprotein Serum (von W.Rollinger(75) zur Verfügung gestellt, 1:300 mit PBS verdünnt) diente als positive Kontrolle. In Parallelansätzen wurde zu den beschichteten Erythrozyten jeweils 100, 150 oder 200µl des Kulturüberstandes gegeben.

Die Ergebnisse aus drei Versuchen sind in der Tab. 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Lyse der mit Lipoprotein beschichteten Erythrozyten durch Überstand der Zellinie LP14

Kultur-Überstand in µl	NS1	HBSS	H_2O	Kaninchen-anti-Lipoprotein Serum	LP14
100	-	-	(+)	-	-
150	-	-	++	(+)	(+)
200	-	-	++	++	+

- keine Lyse, (+) leichte Lyse, + gute Lyse,
++ sehr gute Lyse

Es wurde eine gute Lyse der mit Lipoprotein beschichteten Erythrozyten durch den Kulturüberstand der LP14 bei einer ebenfalls guten Hämolyse der positiven Kontrolle und keiner Hämolyse mit der negative Kontrolle erhalten.

3.2.5 Immunpräzipitation

Eine OM-Präparation des Stammes JE5512 (vorher 5 Min. bei 100°C mit 2% SDS solubilisiert) wurde mit dem Kulturüberstand der Zellinie LP14 inkubiert und die Präzipitation mit K-a-M-Antikörper verstärkt. Nach der Zentrifugation wurde die Anwesenheit von Lipoprotein im Präzipitat gelelektrophoretisch und mit dem ELISA nachgewiesen.
Die Immunpräzipitationen wurden wie beschrieben (2.2.34) durchgeführt.
Die Ergebnisse aus zwei Versuchen sind in der Abb. 5 zu sehen. Die mAK der Zellinie LP14 präzipitieren selektiv eine Bande der OM des Stammes JE5512,die im Bereich des Lipoproteins liegt.

Diese Bande,wie aus den Kontrollansätzen zu entnehmen ist (Abb. 5), kommt aus der OM-Präparation und wird mit NS1 Kulturüberstand nicht ausgefällt.

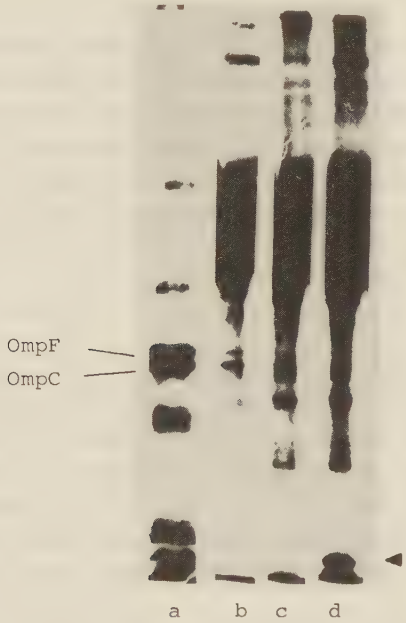


Abb. 5: Immunpräzipitation der OM von JE5512 mit Kulturüberstand der Zellinie LP14

a) OM-Präparation von JE5512

b) OM (JE5512) präzipitiert mit Kulturüberstand der NS1 (mit K-a-M)

c) Kulturüberstand der LP14(mit K-a-M) ohne OM von JE5512

d) OM (JE5512) präzipitiert mit Kulturüberstand der LP14(mit K-a-M)

Mit den Präzipitaten der einzelnen Ansätze wurden auch ELISA-Platten beschichtet und das Vorhandensein von Lipoprotein mit spezifischen Kaninchen-anti-Lipoprotein-Antikörper untersucht (der ELISA wurde von W.Rollinger(75) durchgeführt). Man bekam eine positive Reaktion nur in dem Ansatz wo OM von JE5512 mit Kulturüberstand der LP14 präzipitiert wurde. Alle Kontrollansätze waren negativ.

3.3 Hybridomazelline AJ216

3.3.1.1 Immunisierung

Eine 6 Wochen alte Maus wurde mit 80µg einer OM-Präparation der fur 79 Mutante (Stamm H1426, Abb. 22) intraperitoneal immunisiert. Die fur-Mutante wurde genommen,um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen Antikörper gegen die Eisen-Rezeptoren der OM zu bekommen. Nach 4 Wochen und 3 Tage vor der Fusion wurde die Maus zur zweiten Immunisierung mit derselben Menge gespritzt.

3.3.1.2 Fusion

Durchführung der Fusion wie beschrieben (2.2.21). Das Fusionsreagenz bestand aus 3g PEG (2000, vorher autoklaviert) mit 0,3ml DMSO und 3ml PBS. Mit 1ml dieser Lösung wurde 90 Sek. bei 37°C inkubiert. Die Zellen der Fusion wurden in 144 Kulturen zu 1,5ml verteilt. Pro Kultur wurden $5x10^4$ Peritoneal-Makrophagen zugesetzt (Isolierung: 2.2.20).
Es wuchsen 73 Hybridklone d.h. die Ausbeute betrug 51%.

3.3.1.3 Screening der Hybrid-Klone

Die 73 Hybrid-Kulturen der Fusion wurden mit ELISA (Peroxidase gekoppelt an K-a-M vorher mit E.coli adsorbiert, 2.2.24) getestet. Die ELISA-Platten wurden mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 in einer Konzentration von 20µg/ml (Fluram-Bestimmung) beschichtet. 4 Hybrid-Klone waren positiv verglichen mit der NS1 Kontrolle. Ihre Extinktionswerte lagen bei 0,2-0,4. Drei Hybrid-Klone waren stark positiv mit Extinktionswerte bei 0,7.

3.3.1.4 Subklonierungen, Screening der Subklonen, und Subklassen-Bestimmung

Die stark positiven Hybrid-Klone wurden nach der Flüssig-Methode subkloniert (2.2.22). Das Screening der angewachsenen Subklone erfolgte durch ELISA (Peroxidase). Bei den stark positiven Klonen lagen die Extinktionswerte (NS1 als Leerwert) bei 0,7. Die Subklassen-Bestimmung der Antikörper eines Subklons, der stark positiv war, ergab die Subklasse IgG2b und als leichte Kette kappa. Die Zellinie war also monoklonal.
Trotzdem wurde dieser Subklon ein zweites Mal subkloniert. Das Screening der Subklonen erfolgte wie bei der ersten Subklonierung und die Subklassen-Bestimmung bestätigte die Subklasse.

Für alle weiteren Experimente wurde der Kulturüberstand dieses Subklons benutzt und er wurde als Zellinie AJ216 bezeichnet.

3.3.2 Ergebnisse mit Kulturüberstand der Zellinie AJ216

3.3.2.1 ELISA-Test (mit OM des Stammes H1426 und LPS von E.coli K12)

Um zu prüfen, ob die mAK der Zellinie AJ216 gegen LPS gerichtet sind, wurden ELISA-Platten mit verschiedenen Konzentrationen einer OM-Präparation des Stammes H1426 und LPS von E.coli K12 (isoliert von K.Hantke, (76) beschichtet). Als negative Kontrolle wurde Kulturüberstand der Myeloma-Zellinie NS1 mitgetestet. ELISA wurde wie beschrieben durchgeführt (2.2.26). Die Ergebnisse aus drei Tests sind in der Tab. 10 in Form von Extinktionswerten zusammengefaßt.

Aus den Werten der Tab. 10 wird deutlich, daß die mAK der Zellinie AJ216 nicht spezifisch an das LPS binden. Das LPS wurde auch elektrophoretisch untersucht, wobei festgestellt wurde, daß es zu 1% mit Membranproteinen verunreinigt war.

Tabelle 10: Testen der mAK der Zellinie AJ216 (ELISA) mit OM-Präparation des Stammes H1426 und LPS von E.coli K12

	LPS von E.coli K12					OM-Präparation des Stammes H1426				
Beschichtung in µg/ml	20	2	0,2	0,04	0,008	20	2	0,2	0,04	0,008
NS1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AJ216	0,4	0,2	0,04	0,02	0	1	0,9	0,4	0,25	0,03

Extinktion bei 450nm

3.3.2.2 Agglutinations-Test

Überstand der Zellinie AJ216 wurde Bakterienkulturen zugegeben. Besaß der Überstand Antikörper, die gegen Bestandteile der Bakterien-Oberfläche gerichtet waren, kam es zu einer Agglutination der Bakterien. Die Agglutination wurde mit einem zweiten Antikörper (K-a-M) verstärkt. Die Tests wurden mikroskopisch ausgewertet und wie beschrieben (2.2.30) durchgeführt.
Das gelelektrophoretische Bandenmuster der OM der benutzten Stämmen ist in der Abb. 2 zu sehen. Dem Stamm JW 030 fehlen die Hauptproteine und er besitzt das Ersatzprotein PhoE. Dieses Protein ist dem OmpF sehr ähnlich (3).

Die Resultate aus fünf Tests sind in der Tab. 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Agglutination von Bakterienstämmen durch Kultur-Überstand der Zellinie AJ216

	E.coli K12-Stämme			
Kultur-Überstand	AB2847 fhuA$^+$ ompF$^+$ ompC$^+$	H315 fhuA$^+$ ompF$^+$ ompC	JW030 fhuA$^+$ ompF ompC phoE^c	72-6 fhuA ompF ompC$^+$
NS1	-	-	-	-
AJ216	+	++	+	-

zur Tab. 11:
- keine Agglutination, + gute Agglutination, ++ starke Agglutination

Mit den Bakterienstämmen AB2847, H315 und JWO3O die FhuA besitzen bekommt man eine gute Agglutination. Mit dem Stamm 72-6 der kein FhuA besitzt,bekommt man eine Agglutination. Eine spezifische Bindung der mAK an die Hauptproteine kann man nach den Ergebnissen der Tab. 11 mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

3.3.2.3 ELISA (Beschichtung mit ganzen Bakterien)

Die ELISA-Platten wurden mit ganzen Bakterien beschichtet (2.2.26). Getestet wurde die Reaktion der mAK im Kulturüberstand der Zellinie AJ216 gegen folgende Stämme: AB2847, H315, JWO3O und 72-6. Das Gelelektrophoretische Bandenmuster der OM dieser Stämme ist in der Abb. 2 zu sehen. ELISA wurde wie beschrieben durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde NS1 Überstand mitgetestet und als positive Kontrolle das Serum einer Maus (1:1OOO mit Beschichtungspuffer verdünnt), die mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 immunisiert wurde.

Die Ergebnisse aus zwei Tests sind in der Tab. 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12: Testen des Kulturüberstandes der Zellinie AJ216 mit ELISA (Beschichtung mit ganzen Bakterien)

	E.coli K12-Stämme			
Kultur-Überstand	AB2847 *fhuA*$^+$ *ompF*$^+$ *ompC*$^+$	H315 *fhuA*$^+$ *ompF*$^+$ *ompC*	JWO3O *fhuA*$^+$ *ompF ompC* *phoE*^{C}	72-6 *fhuA* *ompF ompC*$^+$
NS1	O	O	O	O
Mausserum	O,O4	O,O4	O,O4	O,O4
AJ216	O,3	O,4	O,3	O,15

Extinktion bei 45Onm

Man bekommt gute Extinktionswerte mit den Stämmen die FhuA besitzen und den niedrigsten Extinktionswert mit dem Stamm 72-6,der kein FhuA besitzt. Außer einer spezifischen Reaktion der mAK mit dem FhuA-Rezeptorprotein kann man aus der Tab. 12 auch eine Kreuzreaktion der mAK mit den Hauptproteinen ableiten.
Um den Einfluß der Bakterien-Beschichtungsdichte bei den ELISA-Platten auf die Extinktionswerte zu untersuchen,wurde folgendes Kontrollexperiment durchgeführt:
Vertiefungen einer ELISA-Platte wurde mit verschiedenen Bakteriendichten desselben Stammes beschichtet. Es stellte sich heraus,daß ein Unterschied in der Beschichtung von OD 0,3 bis 0,9 keine Auswirkungen auf die Extinktionswerte hatte.

3.3.2.4 ELISA mit Banden einer präparativen-Gelelektrophorese

Die Proteine einer OM-Präparation des Stammes H1426 wurden mittels einer präparativen SDS-PAGE getrennt. Die Banden wurden mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen. Von den einzelnen Fraktionen wurde eine SDS-PAGE (analytisch) gefahren und die Proteine charakterisiert.
Das SDS (des Elektrodenpuffers) wurde ausgefällt,und mit den einzelnen Fraktionen wurden ELISA-Platten beschichtet. Es wurde erwartet,daß die mAK der Zellinie AJ216 nur mit einigen Fraktionen positiv reagieren würden.
Die präparative-Gelelektrophorese,das Ausfällen von SDS und ELISA wurden wie beschrieben (2.2.5) durchgeführt.
Die Protein-Banden der Fraktionen mit denen die ELISA-Platten beschichtet wurden,sind in der Abb. 6 zu sehen.

Mit der Methode konnte nur eine grobe Trennung der OM-Proteine erreicht werden.
Als negative Kontrolle beim ELISA wurde der NS1 Kulturüberstand mitgetestet. Die ELISA-Platten wurden mit zwei Verdünnungen (1:10 und 1:50 mit Beschichtungspuffer) der Fraktionen beschichtet,um den Zusammenhang der Beschichtungskonzentration

mit den Extinktionswerten zu testen.

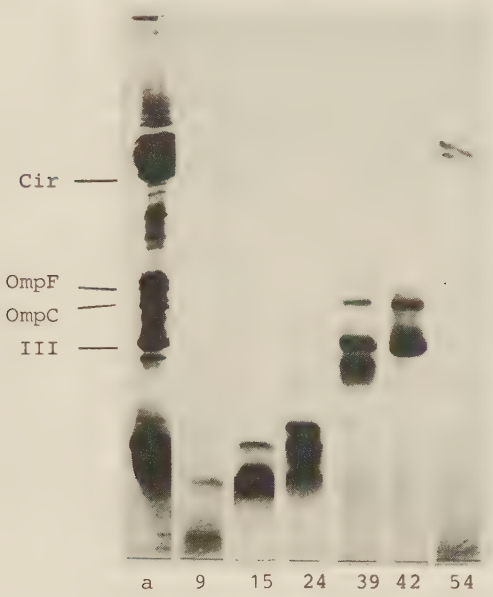


Abb. 6: Trennung der OM-Proteine des Stammes H1426 mittels präparativer Gelelektrophorese.

a) OM-Präparation des Stammes H1426

9,15,24,39,42,54: Nr.der Fraktionen

Die Ergebnisse aus zwei Tests sind in der Tab. 13 zusammengefaßt.

Die mAK reagieren in der Verdünnung 1:10 mit allen getesteten Fraktionen. Man könnte daraus eine Kreuzreaktion der Antikörper mit mehreren OM-Proteinen ableiten. Dabei soll aber beton werden,daß erstens die Trennung der Proteine mit der Methode sehr schlecht ist,und zweitens,daß die Proteine nach der Methode nicht mehr in ihrer nativen Form sind. Zusätzlich nimmt die Reaktion der mAK mit den Fraktionen 15, 24 und 42

bei der 1:50 Verdünnung nur leicht ab,wobei diese Fraktionen laut Abb. 6 Bruchteile von Proteine aufweisen,die nicht in der OM-Präparation (Abb. 6, Spur: a) zu sehen sind.

Tabelle 13: Testen des Kulturüberstandes der Zellinie AJ216 durch ELISA mit Fraktionen einer präparativen-Gelelektrophorese einer OM-Präparation des Stammes H1426

	Verdünnung der Fraktion	Fraktions Nr.					
		9	15	24	39	42	54
NS1	1:10	0	0	0	0	0	0
	1:50	0	0	0	0	0	0
AJ216	1:10	0,1	0,5	0,45	0,25	0,5	0,2
	1:50	0,03	0,38	0,35	0,04	0,25	0,04

Extinktion bei 450nm

3.3.2.5 ELISA (Hauptproteine, MLP, FLP)

ELISA-Platten wurden mit folgenden Lösungen beschichtet:

a) Ein Gemisch aus OmpF und OmpC
   Unter denaturierenden Bedingungen von K.Hantke isoliert
b) Ein Gemisch aus OmpF und OmpC
   Als native Trimere von U.Henning isoliert.
c) mit FLP (isoliert von S.Mollner)
d) mit MLP (isoliert von S.Mollner)

Die Beschichtungskonzentration aller Lösungen betrug 20µg/ml.

ELISA wurde wie beschrieben (2.2.26) durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde NS1 Überstand mitgetestet und als positive Kontrolle Serum einer Maus (1:1000 mit Beschichtungspuffer verdünnt),die mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 immunisiert wurde.

Die Ergebnisse sind in der Tab. 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14: Testen des Kulturüberstandes der Zellinie AJ216 durch ELISA beschichtet mit den Hauptproteinen, MLP, FLP

	OmpF + OmpC denaturiert	OmpF + OmpC nativ	FLP	MLP
NS1	0	0	0	0
Mausserum	0,19	0,22	0,22	0,24
AJ216	0,09	0,21	0,01	0,01

Extinktion bei 450nm

Die Ergebnisse kann man in folgenden Punkten zusammenfassen:

1) Bei der positive Kontrolle lag der Extinktionswert bei allen Vertiefungen bei 0,22. Dies bedeutet,daß die unterschiedlichen Extiktionswerte in den übrigen Vertiefungen nicht auf eine unterschiedliche Beschichtungsdichte zurückzuführen sind.
2) Die NS1 Kontrolle zeigte bei allen Vertiefungen keine positive Reaktion
3) Die mAK zeigen eine deutliche Reaktion mit der Hauptprotein-Lösung in welcher die Proteine in ihrer nativen Form vorliegen.
4) Die mAK reagieren nicht mit MLP und FLP.

3.3.3 Ergebnisse mit isolierten Antikörpern der Zellinie AJ216

3.3.3.1 Isolierung der Antikörper aus Kulturüberstand der Zellinie AJ216 mit Protein A-Sepharose

Um die Antikörper aus dem Kulturüberstand der Zellinie AJ216 zu reinigen und sie für Funktionstests zu konzentrieren, wurden sie mittels einer Protein A-Sepharose Säule isoliert.

200ml des Zellkulturüberstandes wurde in 18 Std. über die Säule

gepumpt. Anschließend wurde mit 50ml PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,1M Essigsäure. Die Fraktionen wurden mit 0,2M Tris auf pH 7,5-8 eingestellt. Für weitere Versuche wurden zwei Fraktionen (jeweils 0,5ml) vereinigt. Sie enthielten 3mg Protein. Die Antikörper wurden in der SDS-PAGE analysiert (Abb. 7).

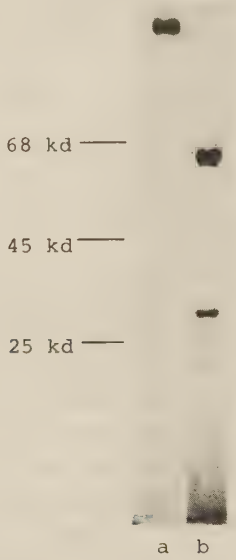


Abb. 7: SDS-PAGE der isolierten AJ216 Antikörper
a) nicht reduzierte Antikörper
b) mit Mercaptoäthanol reduzierte Antikörper

Bei den nicht reduzierten Antikörper tritt nur eine Bande bei 150kd auf. Bei den reduzierten Antikörper treten eine Bande bei 55kd (schwere Kette) und zwei Banden bei 25kd(leichte Kette) auf.

3.3.3.2 Charakterisierung der isolierten Antikörper

Die isolierten Antikörper wurden mit dem ELISA getestet,wobei mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 beschichtet worden war. Die Fraktion wurde mit Beschichtungspuffer verdünnt. Es wurden folgende Extinktionswerte erhalten:

NS1:	: 0
AJ216(Kulturüberstand):	0,6

AJ216(isol. 1:100) : 1,0
AJ216(isol. 1:500) : 0,4

Die Antikörper waren also nach der Isolierung noch aktiv gegen die Membran von H1426 und sie wurden etwa um den Faktor 200 konzentriert.
Eine Subklassen-Bestimmung (2.2.27) ergab die selbe Subklasse wie beim Kulturüberstand, IgG2b und als leichte Kette kappa.

Im Kulturüberstand der AJ216 hatten die Antikörper eine Konzentration von ca. 25µg/ml. Bei einer Konzentrierung um den Faktor 200 nach der Isolierung bedeutet dies, daß die isolierte Fraktion eine Antikörper-konzentration von ca. 5mg/ml aufweist. Ausgerechnet mit der Loschmidtschen Zahl bekommt man eine Zahl von ca. $1x10^{16}$ Antikörpermoleküle/ml. Es wurde festgestellt(77), daß die von einer Hybridoma-Zellinie produzierten Antikörper nicht alle gleich sind, sondern eine Mischung darstellen aus Antikörpern, die alle dieselbe schwere Kette haben aber einmal beide leichte Ketten der Milzzelle, oder beide leichten Ketten der Myeloma-Zellinie oder auch Hybrid-Antikörper mit jeweils einer dieser leichten Ketten enthalten. Um also auf die richtige Zahl der Antikörper mit der "richtigen" Spezifität zu kommen, muß man diese Zahl durch 4 teilen.
Bei den folgenden Funktionstests kann man also von ca. $2,5x10^{15}$ Antikörper Moleküle/ml in der isolierten Fraktion ausgehen.

3.3.3.3 ELISA (Beschichtung mit ganzen Bakterien) und Agglutinations-Test mit E.coli K12-Stämmen

Um die Aktivität der isolierten Antikörper zu überprüfen wurden sie mit dem ELISA (Beschichtung mit ganzen Bakterien) und dem Agglutinations-Test (mit den Stämmen: AB2847, H315, JW030, 72-6) geprüft. Die Durchführung der Tests entsprach der mit dem Kulturüberstand der Zellinie AJ216(3.3.2.2, 3.3.2.3).

Die Ergebnisse dieser Tests haben die Ergebnisse der entsprechenden Versuchen mit Kulturüberstand der Zellinie voll bestätigt (Abb. 8).

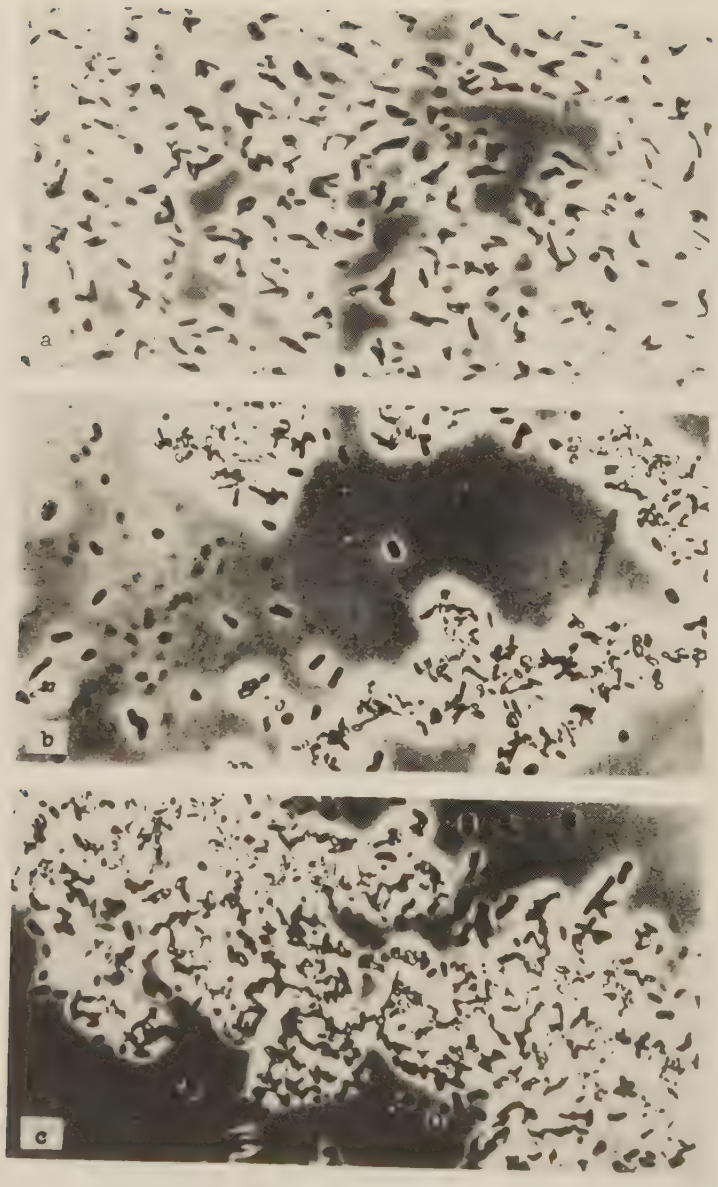


Abb. 8: Agglutination mit isolierten Antikörper der Zellinie AJ216 der E.coli K12 Stämmen:

a) 72-6, b) JWO3O, c) H315

Sowohl beim ELISA als auch beim Agglutinations-Test bekam man eine gute Reaktion mit den Stämmen, die FhuA besitzen (AB2847, H315, JWO3O), und keine Reaktion mit dem Stamm 72-6, der kein FhuA hat. Eine spezifische Bindung der Antikörper an die Hauptproteine konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

3.3.3.4 Kinetik der Phagenadsorption an E.coli K12-Stämmen

Um die Spezifität der isolierten mAK gegen die Rezeptormoleküle der OM von E.coli K12 zu ermitteln wurde die Kinetik der Adsorption verschiedener Phagen gemessen.
Eine Anzahl von Bakterien eines Stammes wurde mit den mAK vorinkubiert. Phagen wurden dazugegeben und durch Probenentnahme in Zeitabständen die Zahl der nicht adsorbierten Phagen ermittelt und eine Phagenbindungskinetik erstellt.
Wenn die mAK eine Spezifität für den entsprechenden Phagenrezeptor der OM besaßen,wurde eine Verhinderung der Adsorption dieser Phagen beobachtet.
Die genaue Charakterisierung der verwendeten Stämmen ist in 2.1.4.1 beschrieben.

Die Beeinflussung der Phagenadsorption durch die mAK wurde immer durch den Vergleich mit folgenden Parallelkinetiken ermittelt: a) Bakterien vorinkubiert mit PBS, b) Bakterien vorinkubiert mit einer Maus-IgG-Antikörper Fraktion (Fa. Paesel, die Konzentration entsprach derjenigen der isolierten mAK-Lösung), c)Bakterien vorinkubiert mit den isolierten Antikörper.

Um diese drei Kinetiken miteinander zu vergleichen,wurde vorher folgendes Kontrollexperiment durchgeführt:
Bakterien wurden unter denselben Versuchsbedingungen mit diesen drei Lösungen inkubiert,und nach der Inkubationszeit wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Man bekam die gleiche Anzahl der Bakterienkolonien bei allen drei Ansätzen.

Bei allen Kinetiken hatte die Adsorptionskurve mit PBS den selben Verlauf wie die mit Maus-IgG,oder die Adsorption der

Phagen in der Probe mit PBS war etwas besser. Der Vergleich von PBS und Maus-IgG war somit eine interne Kontrolle bei den Kinetiken.

3.3.3.5 Kinetik der T5-Adsorption (Stämme: W3110 und HO831)

Der Stamm W3110 ist der Wildtypstamm und besitzt eine normale Anzahl an FhuA-Rezeptoren in seiner OM. Der Stamm HO831 wurde bei 30°C in TY-Medium mit 50µg/ml Neomycin (Stabilisierung des Plasmids) und 0,2% Glukose angezogen. Unter diesen Anzuchtbedingungen weist der Stamm eine leichte Überproduktion an FhuA-Rezeptoren auf (78).
Die Kinetiken wurden wie beschrieben (2.2.28) durchgeführt. Es wurde der T5-Weidel Phage eingesetzt.
Das Verhältnis FhuA-Rezeptoren:Antikörper war für beide Tests 1:50 und das Verhältnis Bakterien:Phagen 100:1 für die Tests mit dem Stamm HO831 und 1000:1 mit dem Stamm W3110.

Die Ergebnisse aus vier Tests sind in den Abb. 9 und 10 wiedergegeben.

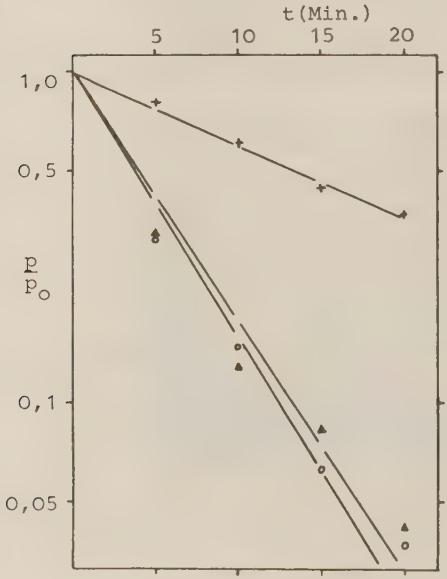


Abb. 9

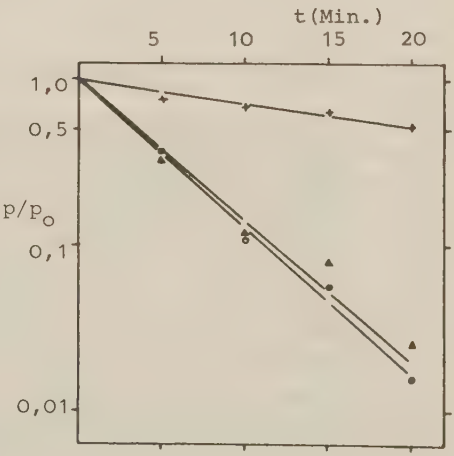


Abb. 10

Abb. 9:

T5-Adsorption an den Stamm W3110
Zelldichte: $5x10^9$/ml
Phagen: $5x10^6$ pfu/ml
Ansatz: 100µl

Δ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG (25µg/Ansatz)
+ mit AJ216-Antikörper (25µg/Ansatz)

Abb. 10:

T5-Adsorption an den Stamm HO831
Zelldichte: $5x10^8$/ml
Phagen: $5x10^6$ pfu/ml
Ansatz: 100µl

Δ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG (25µg/Ansatz)
+ mit AJ216-Antikörper (25µg/Ansatz)

Aus den Daten lassen sich folgende Adsorptionskonstanten berechnen (2.2.28):

T5: E.coli K12 W3110: mit AJ216 Antikörper: $9,51x10^{-12}$ml/Min.
mit Maus-IgG : $3,37x10^{-11}$ml/Min.
HO831: mit AJ216 Antikörper: $1,2\ x10^{-11}$ml/Min.
mit Maus-IgG : $8,14x10^{-11}$ml/Min.

Die isolierten mAK verhindern also die Adsorption der T5 Phagen an dem Stamm W3110. Die Adsorptionskonstante wird durch die AJ216 Antikörper um den Faktor 3,5 vermindert. Stärker wird die Adsorption durch die Antikörper an den Stamm HO831 verhindert. Man bekommt eine Verminderung der Adsorptionskonstante um den Faktor 6,8 .

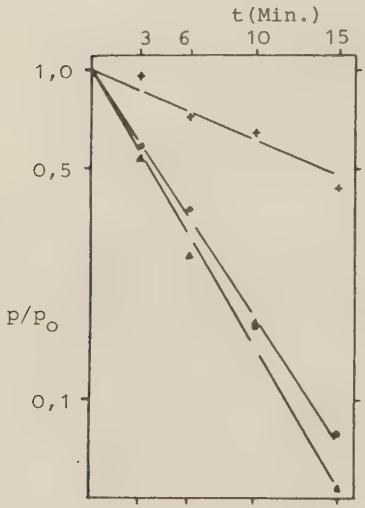
3.3.3.6 Kinetik der Ø80-, und T1-Adsorption (Stamm HO831)

Es ist bekannt, daß die beiden Phagen Ø80 und T1 das FhuA-Rezeptorprotein der OM für ihre Adsorption an die E.coli Zelle brauchen wie der T5 (27). In diese Tests wurde die Beeinflussung ihrer Adsorption an den Stamm HO831 durch die isolierten mAK der AJ216 untersucht.

Der Stamm HO831 wurde wie in 3.3.3.5 beschrieben gezüchtet. Die Kinetiken wurden wie beschrieben (2.2.28) durchgeführt. Das Bakterien:Phagen Verhältnis war bei diesen Tests 200:1 und das Verhältnis FhuA-Rezeptoren:Antikörper 1:50 .
Da die T1-Adsorption durch Maus-IgG behindert wurde und diese Behinderung auch nicht durch Inaktivierung des Komplements

aufgehoben werden konnte, wurde statt Maus-IgG BSA in gleicher Konzentration eingesetzt.

Die Ergebnisse aus jeweils vier Tests sind in den Abb. 11 und 12 wiedergegeben.



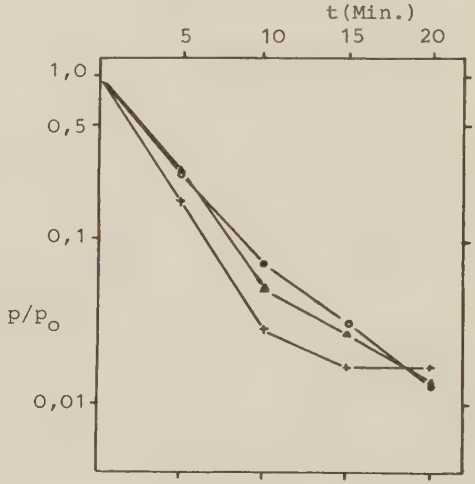


Abb. 11:

T1-Adsorption an den Stamm HO831
Zelldichte: $8{,}5 \times 10^8$/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml
Ansatz: 100µl

▲ Kontrolle mit PBS
● Kontrolle mit BSA (125µg/Ansatz)
\+ mit AJ216-Antikörper (125µg/Ansatz)

Abb. 12:

Ø80-Adsorption an den Stamm HO831
Zelldichte: $2{,}5 \times 10^9$/ml

Phagen: 5×10^6pfu/ml
Ansatz: 100µl

▲ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG (125µg/Ansatz)
\+ mit AJ216-Antikörper (125µg/Ansatz)

Aus den Daten lassen sich folgende Adsorptionskonstanten berechnen:

Ø80: E.coli K12 HO831: mit AJ216 Antikörper: $1{,}18 \times 10^{-10}$ml/Min.

mit Maus-IgG : $9{,}8 \times 10^{-11}$ml/Min.

T1: E.coli K12 HO831: mit AJ216 Antikörper: $5{,}68 \times 10^{-11}$ ml/Min.
mit BSA : $2{,}16 \times 10^{-10}$ ml/Min.

Die Adsorption der Phagen Ø80 wird durch die mAK nicht gehindert. Der Quotient der Phagenadsorptionskonstanten zwischen AJ216-Antikörper und Maus-IgG betrug 0,83.
Die Adsorption der T1-Phagen wurde durch die Antikörper verhindert. Die Adsorptionskonstante der T1-Phagen wurde durch die AJ216 Antikörper um den Faktor 3,8 vermindert.

3.3.3.7 Kinetik der T2-Adsorption (Stämme: H315 und 1024)

Um die Spezifität der Bindungshemmung von T5 und T1 an E.coli durch die isolierten AJ216-Antikörper zu überprüfen wurden T2 Adsorptionskinetiken durchgeführt.
Der Phage T2 benutzt das OmpF Hauptprotein der OM für seine Adsorption an die E.coli Zelle.
Die Beeinflussung der T2-Phagen Adsorption durch die AJ216 Antikörper wurde an den Stämmen H315 ($fhuA^+$, $ompF^+$) und 1024 (fhuA, $ompF^+$) untersucht.

Die Phagenbindungs-Kinetiken wurden wie beschrieben(2.2.28) durchgeführt. Das Bakterien:Phagen Verhältnis war 100:1 und das Verhältnis der OmpF-Rezeptoren:Antikörper 1:50 .
Die Ergebnisse aus jeweils drei Tests sind in den Abb. 13 und 14 wiedergegeben.

Aus den Daten lassen sich folgende Adsorptionskonstanten berechnen:

T2: E.coli K12 H315: mit AJ216-Antikörper: $1{,}45 \times 10^{-10}$ ml/Min.
mit Maus-IgG : $3{,}04 \times 10^{-10}$ ml/Min.

1024: mit AJ216-Antikörper: $2{,}7 \times 10^{-10}$ ml/Min.
mit Maus-IgG : $4{,}92 \times 10^{-10}$ ml/Min.

Die Adsorption der Phagen T2 an die H315 Zellen wird durch die mAK gehemmt. Die Verminderung der Adsorptionskonstante durch die Antikörper beträgt 1,96. Die Hemmung ist deutlich schwächer als die der T5-Phagen (Tab. 15).

Die T2 Adsorption wird durch die selben mAK nicht gehemmt, wenn man für die Kinetiken den Stamm 1024 einsetzt, der ompF$^+$ und fhuA ist (Quotient der Adsorptionskonstanten zwischen mAK und Maus-IgG: 1,08).

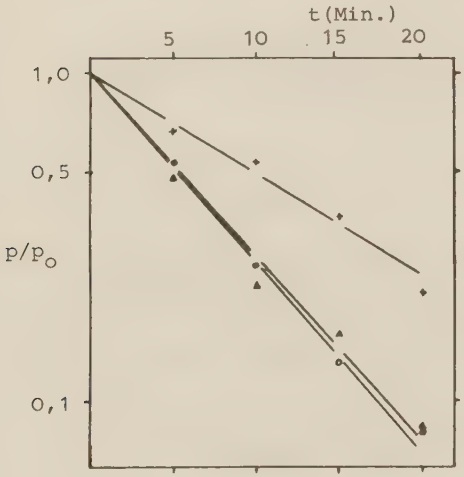


Abb. 13:

T2-Adsorption an den Stamm H315
Zelldichte: $5x10^8$/ml
Phagen: $5x10^6$pfu/ml
Ansatz: 100µl
Δ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG (250µg/Ansatz)
\+ mit AJ216-Antikörper (250µg/Ansatz)

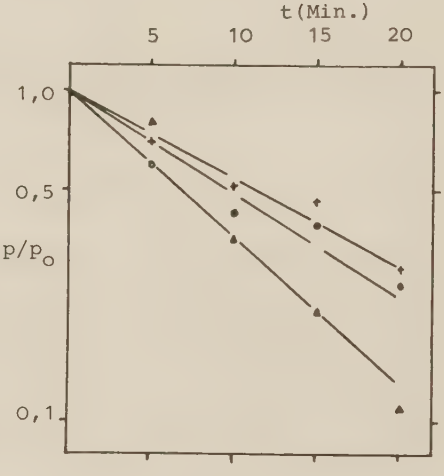


Abb. 14:

T2-Adsorption an den Stamm 1024
Zelldichte: $5x10^8$/ml
Phagen: $5x10^6$pfu/ml
Ansatz: 100µl
Δ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG (250µg/Ansatz)
\+ mit AJ216-Antikörper (250µg/Ansatz)

3.3.3.8 Kinetik der T6-, und TuIb-Adsorption (Stämme:W3110 und 72-6)

Der Phage T6 benutzt das Tsx-Protein der OM für seine Adsorption an die E.coli Zelle. Der Phage TuIb benutzt das Hauptprotein OmpC. Diese Kinetiken wurden durchgeführt, um festzu-

stellen in welchem Maß die isolierten mAK der Zellinie AJ216 die Adsorption auch anderer Phagen hemmen können,die weder das FhuA noch das Hauptprotein OmpF für ihre Adsorption benötigen.

Der Stamm W3110 ist der Wildtyp (*fhuA*$^+$, *ompC*$^+$, *tsx*$^+$) und der Stamm 72-6 (*fhuA*, *tsx*$^+$).
Die Kinetiken wurden wie beschrieben (2.2.28) durchgeführt.
Die T6 Kinetiken wurden in NB-Medium mit 1% NaCl durchgeführt.
Das Bakterien:Phagen Verhältnis war 50:1 und das Verhältnis der OmpC-Rezeptoren:Antikörper 1:50 .

Die Ergebnisse aus mehreren Tests mit den beiden Stämmen sind in den Abbildungen 15-18 wiedergegeben.

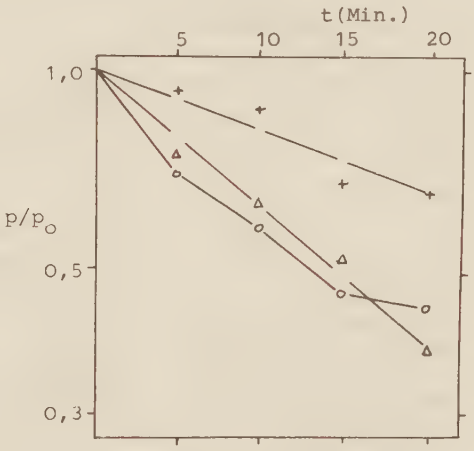


Abb. 15:

T6-Adsorption an den Stamm W3110
Zelldichte: $1{,}7 \times 10^8$/ml
Phagen: 5×10^6pfu/ml
Ansatz: 100µl

- Δ Kontrolle mit NB-Medium
- o Kontrolle mit Maus-IgG(125µg/Ansatz)
- \+ mit AJ216-Antikörper (125µg/Ansatz)

Aus den Daten lassen sich folgende Adsorptionskonstanten berechnen:

T6:	*E.coli* K12 W3110:	mit AJ216-Antikörper:	$1{,}21 \times 10^{-10}$ml/Min.
		mit Maus-IgG :	$2{,}86 \times 10^{-10}$ml/Min.
	E.coli K12 72-6 :	mit AJ216-Antikörper:	$3{,}04 \times 10^{-10}$ml/Min.
		mit Maus-IgG :	$3{,}28 \times 10^{-10}$ml/Min.
TuIb:	*E.coli* K12 W3110:	mit AJ216-Antikörper:	$5{,}15 \times 10^{-10}$ml/Min.
		mit Maus-IgG :	$8{,}46 \times 10^{-10}$ml/Min.

E.coli K12 72-6 : mit AJ216-Antikörper: $6{,}76 \times 10^{-10}$ ml/Min.
mit Maus-IgG : $7{,}08 \times 10^{-10}$ ml/Min.

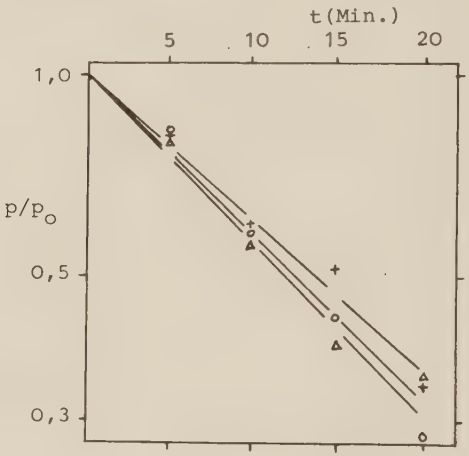


Abb. 16:

T6-Adsorption an den Stamm 72-6
Zelldichte: $1{,}7 \times 10^8$/ml
Phagen: 5×10^6 pfu/ml
Ansatz: 100µl

Δ Kontrolle mit NB-Medium
o Kontrolle mit Maus-IgG(125µg/Ansatz)
+ mit AJ216-Antikörper (125µg/Ansatz)

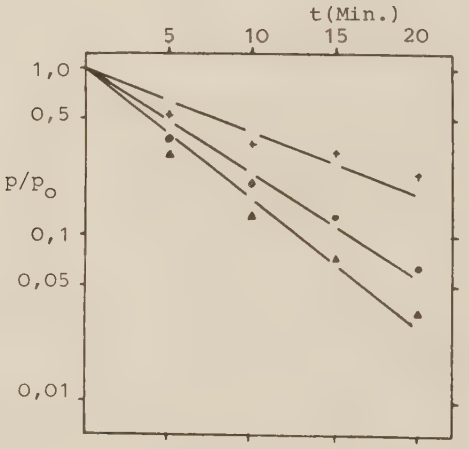


Abb. 17:

TuIb-Adsorption an den Stamm W3110
Zelldichte: $1{,}7 \times 10^8$/ml
Phagen: 5×10^6 pfu/ml
Ansatz: 100µl

Δ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG(125µg/Ansatz)
+ mit AJ216-Antikörper (125µg/Ansatz)

Die Adsorption der Phagen T6 und TuIb an die W3110 Zellen wird durch die mAK der Zellinie AJ216 gehemmt. Durch die Antikörper wird die Adsorptionskonstante der T6-Phagen um den Faktor 2,36 und die der TuIb-Phagen um den Faktor 1,64 vermindert.

Die Hemmung ist aber wesentlich schwächer als die der T5-Phagen (Tab. 15). Die Adsorption beider Phagen (T6, TuIb) wird durch dieselben mAK nicht gehemmt,wenn man für die Kinetiken den Stamm 72-6 einsetzt, der fhuA ist.

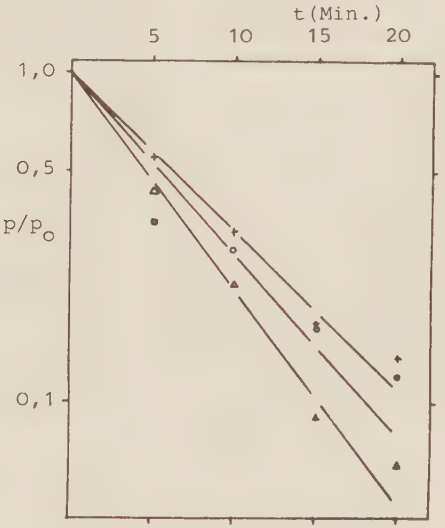


Abb. 18:
TuIb-Adsorption an den Stamm 72-6
Zelldichte: $1{,}7 \times 10^8$/ml
Phagen: 5×10^6 pfu/ml
Ansatz: 100µl
Δ Kontrolle mit PBS
o Kontrolle mit Maus-IgG(125µg/Ansatz)
+ mit AJ216-Antikörper (125µg/Ansatz)

3.3.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Phagenadsorptions-Kinetiken

Ein Maß für die Beeinflussung der Phagenadsorption durch die Antikörper ist der Quotient:

$$\frac{K_{ads}\ (\text{Maus-IgG})}{K_{ads}\ (\text{mAK})}$$

Die Adsorptionskonstanten wurden nach folgender Näherungsformel berechnet (68):

$$K_{ads} = \frac{2{,}3}{B.t} \log \frac{p_o}{p_t}$$

p= Phagen
B= Bakterien/ml
t= Zeit

Tabelle 15: Quotienten : K_{ads}(Maus-IgG)/K_{ads}(mAK) der Phagenadsorptions-Kinetiken.

	E.coli K12-Stämme				
	W3110 Wildtyp	HO831 fhuA^c (ompF ompC)	H315 ompC	72-6 fhuA ompF	1024 fhuA
T5	3,54	6,81			
Ø80		0,83			
T1		3,8$^+$			
T2			1,96		1,08
T6	2,36			1,08	
TuIb	1,64			1,05	

c= constitutiv

+= Quotient: K_{ads}(BSA)/K_{ads}(mAK)

Aus den Daten dieser Tabelle geht hervor,daß die isolierten mAK der AJ216 spezifisch mit dem FhuA-Rezeptorprotein der OM von E.coli reagieren

3.3.3.10 Kinetik der Colicin M Wirkung

Colicin M benutzt das FhuA-Rezeptorprotein der OM von E.coli als Rezeptor. Zu einer Anzahl Bakterien (W3110),die vorher mit den isolierten mAK der Zellinie AJ216 inkubiert wurden, wurde Colicin M zugegeben. Nach der Colicin Zugabe wurden in zeitlichen Abständen Proben entnommen,entsprechend verdünnt,und die geeignete Verdünnung ausplattiert (Lebendzellzahlbestimmung). Wurden die Zellen vor der Colicin Wirkung geschützt,bekam man eine höhere Lebendzellzahl in der Probe mit mAK als beim Leerwert ohne mAK.

Die Colicin M Kinetiken wurden wie beschrieben (2.2.29) durchgeführt. Es wurde eine aktive Colicin M-Lösung,die von R.Dreher isoliert wurde,benutzt. Als Kontroll-Kinetik wurden im Parallel-Ansatz die Zellen mit einer 1mg/ml (entspricht der Konzentration der eingesetzten mAK) BSA-Lösung inkubiert. In diesem Kontrollansatz waren ca. 95% der Bakterien nach 20 Min. Inkubation mit Colicin M abgetötet.

Die Ergebnisse aus drei Tests sind in der Abb. 19 wiedergegeben.

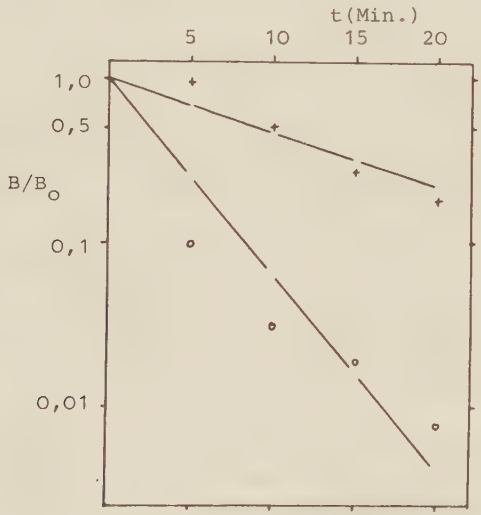


Abb. 19: Kinetik der Colicin M Wirkung an den Stamm W3110
Zelldichte: $3,5 \times 10^7$/ml
Colicin M-Titer: siehe Text
Ansatz: 100µl
o : BSA mit Colicin M
+ : AJ216 Antikörper mit Colicin M

Wie auch aus der Abb. 19 zu entnehmen ist,werden die W3110 Zellen mittels den mAK der AJ216 von der Colicin M Wirkung gerettet.
50% der Bakterien wurden in dem Ansatz mit BSA nach 2,5 Min.

abgetötet. In dem Ansatz mit mAK wurden erst nach 9,5 Min. 50% der Zellen abgetötet. Die Abtötungsrate mit mAK wurde um den Faktor 3,8 verlangsamt.

3.3.3.11 Kinetik der Colicin B Wirkung

Colicin B benutzt das FepA Protein der OM von E.coli als Rezeptor. Um die Spezifität der Rettung der E.coli Zellen vor Colicin M durch die isolierten AJ216 Antikörper zu überprüfen, wurden diese Colicin B Kinetiken durchgeführt. Das Prinzip der Tests ist das gleiche wie bei Colicin M.

Die Kinetiken wurden wie beschrieben (2.2.29) durchgeführt. Es wurde eine aktive Colicin B-Lösung,die von E.Maas isoliert wurde,eingesetzt. Die geeignete Konzentration wurde vorher durch Probekinetiken ermittelt.

Als Kontroll-Kinetik wurden im Parallel-Ansatz Bakterien mit einer 1mg/ml BSA-Lösung inkubiert. Die Vorinkubation mit AJ216 Antikörper und BSA erfolgte 15 Min. bei 37°C. Eine Bestimmung der Zahl der Überlebenden nach dieser Inkubation ergab keine Unterschiede.

Es wurde festgestellt,daß die erste Colicin B Verdünnung(1. Verdünnung) die Zellen sehr schnell abgetötet hat. Deswegen wurden auch Kinetiken,mit einer stärkeren Verdünnung (2. Verdünnung) der Colicin B-Lösung durchgeführt.
Die Ergebnisse sind in den Abb. 20 und 21 wiedergegeben.

Bei beiden Ansätzen mit dem höheren Colicin B-Titer waren unabhängig von der Vorinkubation 50% der Zellen in weniger als 0,5 Min. abgetötet worden.
Beim Ansatz mit dem niedrigeren Colicin B-Titer waren unabhängig von der Vorinkubation 50% der Zellen nach 10 Min. abgetötet worden.

Die mAK der Zellinie AJ216 können die Zellen vor der Colicin B Abtötung also nicht retten. Gleichzeitig kann man aus diesen Colicin B-Kinetiken folgern,daß die Colicine durch die Inkuba-

tion mit den AJ216 Antikörpern nicht inaktiviert werden.

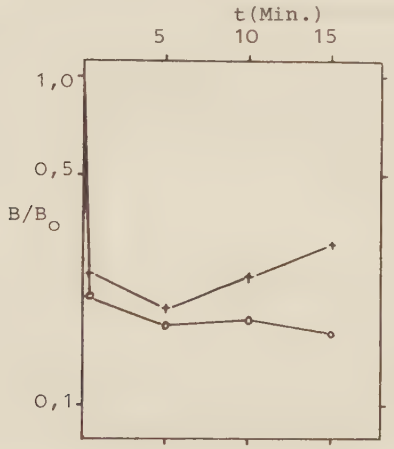


Abb. 20: Kinetik der Colicin B Wirkung auf den Stamm W3110.
Zelldichte: $3,5 \times 10^7$/ml
Colicin B-Titer: 1.Verdünnung siehe Text
o : BSA mit Colicin B(100µg/Ansatz)
+ : AJ216-Antikörper mit Colicin B (100µg/Ansatz)

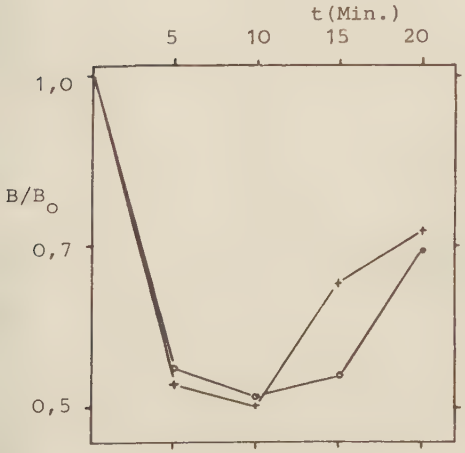


Abb. 21

Abb. 21: Kinetik der Colicin B Wirkung auf den Stamm W3110.
Zelldichte: $3,5 \times 10^7$/ml
Colicin B-Titer: 2.Verdünnung
siehe Text
o : BSA mit Colicin B(100µg/Ansatz)
+ : AJ216-Antikörper mit Colicin B (100µg/Ansatz)

3.3.3.12 Enzymimmunassay mit gelelektrophoretisch isolierten Proteinen der OM

Die Banden einer OM-Präparation des Stammes H1426 wurden mittels einer SDS-PAGE getrennt. Die einzelnen Banden wurden ausgeschnitten,die Proteine eluiert,das SDS ausgefällt und mit dem Kulturüberstand wurden ELISA-Platten beschichtet. Es wurde die Spezifität der mAK der Zellinie AJ216 getestet.

Die Versuche wurden wie beschrieben (2.2.4, 2.2.7, 2.2.26) durchgeführt. Es wurden 20 Banden aus einer SDS-PAGE der OM des Stammes H1426 für die Tests benutzt,die in der Abb. 22 angegeben sind.

Abb. 22: SDS-PAGE der OM des Stammes H1426.
Die numerierten Banden wurden zur Beschichtung der ELISA-Platten benutzt.

Die isolierten mAK der AJ216 wurden in dem ELISA in der 1:100 Verdünnung (verdünnt mit Beschichtungspuffer) eingesetzt. Als negative Kontrolle wurde NS1 Kulturüberstand mitgetestet und als positive Kontrolle das Serum einer Maus (1:300 mit Beschichtungspuffer) verdünnt,die mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 immunisiert wurde.
Die Ergebnisse aus zwei Tests sind in der Tab. 16 wiedergegeben.

Tabelle 16: Ergebnis des Enzymimmunassays mit gelelektrophoretisch isolierten Proteinen der OM.

Banden Nr.	Bezeichnung des Proteins	Mausserum	isol.AJ216 Antikörper	AJ216(a) normiert
		Extinktion bei 450nm		
1		0,18	0,76	4,22
2		0,14	0,68	4,86
3		0,16	0,66	4,13
4	Fiu	0,13	0,57	4,38
5	FepA/FecA	0,10	0,47	4,70
6	FhuA	0,17	0,69	4,06
7	FhuE	0,13	0,64	4,92
8	Cir	0,13	0,60	4,62
9	BtuB	0,15	0,67	4,47
10		0,15	0,70	4,67
11		0,18	0,59	3,28
12	Protein a	0,24	0,62	2,58
13	OmpF	0,20	0,67	3,35
14	OmpC	0,27	0,58	2,15
15	OmpA	0,22	0,57	2,59
16	III	0,21	0,57	2,71
17		0,23	0,68	2,56
18		0,22	0,68	3,09
19		0,20	0,67	3,35
20		0,18	0,68	3,78

Tab. 16:

(a) die Werte ergeben sich: $X = \frac{1}{E_{Mausserum}} \times E_{AJ216}$

Mit NS1 Kulturüberstand lagen die Werte bei allen Banden zwischen 0,01 und 0,02.

Diese Normierung mußte durchgeführt werden,um den unterschiedlichen Proteingehalt der einzelnen Banden zu berücksichtigen. Da das Serum von einer Maus stammt,die mit den gleichen Proteinen immunisiert worden war,kann man annehmen,daß gegen alle Proteine Antikörper im Serum enthalten waren. Es läßt sich weitgehend eine Übereinstimmung zwischen der Stärke der Banden im Gel und der Extinktion mit dem Mausserum beobachten (Ausnahme FecA/FepA).
Die höchsten Werte(nach der Normierung) bekommt man mit Banden aus dem Bereich der Eisen-Aufnahme-Proteine. Die niedrigsten Werten erhält man mit den Banden der Hauptproteine.
Die Ursache der Kreuzreaktion der mAK mit allen Proteinen der OM liegt vermutlich an dem denaturierten Zustand der Proteine nach der SDS-PAGE.

4. DISKUSSION

4.1 Antikörper der Zellinie D24

Die Maus wurde mit einer angereicherten FhuA-Lösung,die den Rezeptor in seiner aktiven Form enthielt,immunisiert. Damit war beabsichtigt,Antikörper zu bekommen,die mit dem nativen Rezeptor reagieren. Aus den Hybridklonen wurde nach den Subklonierungen die Zellinie D24 gewonnen,die Antikörper der Subklasse IgG1/kappa produzierte.

Der erste Hinweis,daß die Antikörper mit FhuA reagieren,war die positive Reaktion mit ELISA mit der Immunisierungslösung. Die Immunisierungslösung enthielt aber auch andere Membran-Proteine(Abb. 1). Das Antigen(FhuA) lag nicht rein vor. Die Spezifität der Antikörper konnte also nur durch Funktionstests an dem Rezeptor und vergleichenden Experimenten erbracht werden. Diese "in vivo" Versuche sind wegen ihrer Optimierung sehr zeitraubend.

Mit Phagenbindungstests konnte gezeigt werden,daß die Antikörper die Adsorption der T5-Phagen an die Bakterien des Stammes AB2847 erheblich vermindern (ca. 4 mal mehr als bei der NS1 Kontrolle, Tab. 1). Die Adsorption des Phagen BF23,der das BtuB Protein der OM als Rezeptor benutzt,konnte durch die Antikörper nicht verhindert werden (Tab. 2). Dies war ein deutlicher Hinweis,daß die Antikörper mit dem FhuA-Rezeptor reagieren. Eine direkte Inaktivierung der Phagen durch die Antikörper konnte ausgeschlossen werden,denn die Phagen T5 und BF23 sind sehr ähnlich(79).

In weiteren Funktionstests wurde gezeigt,daß die Antikörper die Bakterien vor Colicin M retten können (Tab. 3) nicht aber vor der Abtötung durch das Colicin B (Tab. 4). Colicin B benutzt das Protein FepA als Rezeptor. Beide Colicine sind Plasmid-codiert und wirken bei sensitiven Zellen schnell und effektiv(20). Colicin M ist halb so groß (27.000 d.) wie Colicin B und natürlich viel kleiner als der Phage T5. Die Rettung der Zellen vor Colicin M ist deshalb ein deutlicher Hinweis,daß

die Antikörper direkt die Bindungsstelle des Colicins stören.

Die niedrigen Extiktionswerte des ELISA zeigten,daß die Antikörperkonzentration im Zellkulturüberstand gering war. Eine Isolierung der Antikörper durch Protein-A-Sepharose kam,wegen der Subklasse der schweren Kette nicht in Frage. Der Fc-Teil der schweren Kette der IgG1 Antikörper der Maus binden nur schlecht an Protein-A-Sepharose(37).

Nach den guten Ergebnissen der Phagenbindungs-, und Colicin-Teste (trotz des niedrigen Antikörpertiters),war die Frage der Beeinflussung von Eisen(III)-Ferrichrom Aufnahme durch die Antikörper interessant. Diese Versuche konnten mit Kulturüberstand nicht durchgeführt werden. Das Eisen des Fötalen Kälberserums hätte die Experimente gestört. Deswegen wurden die Überstände dialysiert. Versuche mit den dialysierten Überständen haben gezeigt,daß die Antikörper die Aufnahme des Eisen(III)-Ferrichroms nicht beeinflussen können(Abb. 3).
Das Ferrichrom-Molekül ist verglichen mit Colicin M und dem Phagen T5 ein sehr kleines Molekül. Trotz des Verhältnisses Antikörper Moleküle zu Rezeptoren von 15:1 könnte sein Bindung nur verhindert werden,wenn die Antikörper an dieselbe Stelle binden würden.

Als schneller Test für die Antikörper-Spezifität gegen Proteine auf der Bakterienoberfläche wurde der Agglutinationstest entwickelt. Der Test funktionierte nur mit einem zweiten Antikörper (Kaninchen-anti-Maus) zur Verstärkung der Reaktion. Zusätzlich mußte man immer die Agglutinationsfähigkeit des Überstandes der Zellinie mit dem der NS1-Linie vergleichen.

Die Antikörper agglutinierten alle drei Bakterienstämme (AB2847, H315, JWO3O), die FhuA besitzen. Der Stamm 72-6, der kein FhuA besitzt,wurde durch die Antikörper nicht agglutiniert (Tab. 5).

Die Agglutination des Stammes JWO3O war deutlich schwächer als die der Stämme AB2847 und H315. Dem Stamm JWO3O fehlen die beiden Hauptproteine OmpF und OmpC und dafür tritt PhoE in größeren Mengen in der OM auf. Die unterschiedliche Reaktion der

Antikörper kann ihre Ursache in der veränderte Organisation der OM haben. Es ist sehr wahrscheinlich,daß die Verteilung des FhuA-Proteins in der OM als auch seine Lage in dieser verändert werden,wenn die Hauptproteine fehlen(3). Der Stamm 72-6 besitzt OmpC und dem Stamm JWO3O fehlen sowohl OmpF als auch OmpC. Deswegen kann man eine Bindung der Antikörper mit den Hauptproteinen auf der Bakterienoberfläche mit großer Wahrscheinlichkeit ausschliessen.

Mit Bestandteilen der OM,die einigermaßen in reiner Form isoliert vorlagen,wurden die Antikörper im ELISA getestet. Die Antikörper zeigten keine Reaktion mit FLP und MLP. Sie reagierten ganz schwach mit den Hauptproteinen OmpF und OmpC (3.1.12). Es wurden zwei Lösungen dieser Proteine getestet. In der ersten Lösung wurden die Proteine unter denaturierten Bedingungen isoliert. Die zweite Lösung enthielt die Hauptproteine,die als native Trimere isoliert wurden. Wegen der schwachen Reaktion der Antikörper (Extinktion O,1) mit beiden Lösungen,kann man eine spezifische Bindung ausschliessen.

Das LPS der Bakterien ist ein starkes Immunogen. Deshalb wurde die Reaktion der Antikörper gegen LPS mit identischen Verdünnungsstufen zweier Lösungen,eine OM-Präparation des Stammes H1426 und mit isoliertem LPS von Escherichia coli K12 getestet. Die Extinktionswerte zeigten,daß die Antikörper nicht mit LPS reagieren (Tab. 6).

Ein weiteres Indiz,daß die Antikörper nicht mit LPS reagieren, ist die ausbleibende Agglutination des Stammes 72-6(Tab. 5). 72-6 ist auch ein K12-Stamm und besitzt dasselbe LPS wie die übrigen drei Stämme.

Um einen höheren Antikörpertiter zu bekommen,wurde mit der Zellinie D24 Ascites Flüssigkeit gewonnen. In der Literatur wird beschrieben,daß man damit den Antikörpertiter um das 10-100 fache steigern kann (63). Die Gelelektrophoretische Untersuchung der Ascitesflüssigkeit zeigte,daß sie außer den schweren und leichten Ketten der Antikörper auch viel Albumin und andere Proteinbanden enthielt (Abb. 4).

Colicin M und Colicin B Tests mit Ascitesflüssigkeit haben die Ergebnisse früheren Tests mit Kulturüberstand bestätigt. Eine Verbesserung der Ergebnisse konnte nicht erreicht werden (Tab. 7).

Zusammenfassend kann man für die Antikörper der Zellinie D24 folgende Aussagen machen.

1) Die Antikörper reagieren spezifisch mit dem FhuA-Rezeptor auf der Bakterienoberfläche.

2) Durch die Bindung an den Rezeptor wird die Adsorption des T5-Phagens und die Aufnahme von Colicin M verhindert.

3) Die Aufnahme des Eisen(III)-Ferrichroms wird durch die Bindung der Antikörper nicht beeinflußt.

4) Wenn die Hauptproteine OmpF und OmpC in der OM fehlen, binden die Antikörper schwächer an den FhuA-Rezeptor. OmpF und OmpC tragen offensichtlich zur Stabilisierung des FhuA-Rezeptors in der Membran bei.

4.2 Antikörper der Zellinie LP14

Es ist bekannt,daß Muropeptide immunogen sind (17). Um Antikörper zu bekommen,die gegen das Lipoprotein Molekül gerichtet sind,wurde die Maus mit FLP immunisiert und nicht mit dem Murein gebundenen Lipoprotein.

Da FLP isoliert vorlag,wurden die Hybridklone der Fusion im ELISA gegen FLP getestet. Die Zellinie LP14,die aus zwei Subklonierungen hervorgegangen ist,zeigte in diesem Test eine positive Reaktion. Eine Subklassen-Bestimmung ergab,daß die Antikörper monoklonal waren,mit IgG2a als Subklasse der schweren Kette und kappa als leichte Kette.

Die Antikörper wurden im Agglutinationstest mit verschiedenen E.coli K12 Stämmen getestet. Bis heute konnte keine Rezeptorfunktion für das Lipoprotein nachgewiesen werden. Die Frage,ob ein Teil des Moleküls von der Außenseite der OM zugänglich ist,

konnte auch nicht eindeutig beantwortet werden(80). Der Stamm JE5512 besitzt Lipoprotein,während der Stamm JE5513 eine Deletion im Lipoprotein-Gen hat.

Interessant schien also die Prüfung der Antikörper im Agglutinationstest mit den beiden Stämmen. Die Antikörper agglutinierten stärker die Bakterien des Stammes JE5512 (Tab. 8). Allerdings war der Unterschied zu dem Stamm JE5513 gering,und erst nach der Auswertung von mehreren identisch durchgeführten Tests deutlich erkennbar.
Als Ergebnis dieser Tests kann man also formulieren,daß das Lipoprotein von der Außenseite der OM nur schwer zugänglich ist. Die leichte Agglutination des Stammes JE5513 berechtigt die Frage,ob die Antikörper mit den übrigen Lipoproteinen,die in E.coli nachgewiesen wurden (81),kreuzreagieren.

An dieser Stelle sollte betont werden,daß die teilweise fehlende genaue Charakterisierung einiger Bakterienstämme die Interpretation der Ergebnisse erschwert haben. Die Tests,mit denen die einzelnen Mutanten identifiziert werden,geben keine Auskunft darüber,ob Reste des entsprechenden Proteins oder ein in der Sequenz verändertes Protein in der Membran der Mutante vorhanden ist.

Die funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Mutanten wäre aber die Voraussetzung für die eindeutige Charakterisierung der Antikörperspezifität,weil die Proteine der OM nur schwer in reiner Form isoliert werden können. Bei der Isolierung der Proteine der OM muß man denaturierende Bedingungen anwenden. Die Antigendeterminanten eines denaturierten Proteins sind aber nicht mit denen des nativen Proteins gleich(34). Dies ist besonders für die monoklonale Antikörper wichtig,die eine kleine Antigendeterminante (3-6 Aminosäuren) erkennen.

Die polyklonalen Seren sind eine Mischung aus Antikörpern,die verschiedene Antigendeterminanten eines Proteins erkennen. Die Reaktion eines polyklonalen Serums ist eine Addition der Reaktionen der einzelnen Antikörper. Deswegen bekommt man mit polyklonalen Seren sehr häufig Kreuzreaktionen. 1982 wurde ein

Modell von Lane und Koprowski vorgeschlagen,welches Aspekte der Kreuzreaktion mit Proteinen verdeutlicht. Ursache für die Kreuzreaktion ist,daß die Antikörper nur eine kurze Antigendeterminante erkennen (82).
Das Modell ist in der Abbildung 23 wiedergegeben.

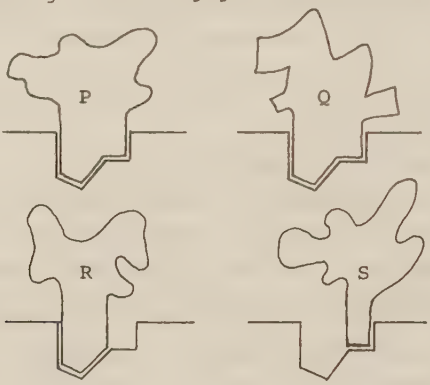


Abb. 23

Dieselben monoklonalen Antikörper,die mit einer Antigendeterminante des Proteins P reagieren,können genauso stark mit einem zweiten Protein Q reagieren. Dieses zweite Protein unterscheidet sich völlig vom Protein P und hat nur diese gemeinsame Determinante gleich. Ein polyklonales Serum hätte auch kreuzreagiert,aber die Reaktion mit diesem zweiten Protein wäre deutlich schwächer.
Diese monoklonalen Antikörper können aber auch mit zwei Proteinen R und S kreuzreagieren,die jeweils nur einen Teil der Antigendeterminante des Proteins P haben. Die Reaktion der Antikörper mit den Proteinen R und S ist schwächer als mit dem Protein P. Die selben monoklonalen Antikörper reagieren mit zwei Proteinen kreuz(R und S),die keine gemeinsame Antigendeterminante haben (Abb. 23).

Dieser Aspekt ist sehr wichtig für die Arbeit. Es ist festgestellt worden,daß Proteine der OM wie die Hauptproteine gemeinsame Sequenzen haben(3). Dies ist auch für die anderen Proteine der OM anzunehmen aus ihrer Funktion her und ihrer möglicher-

weise gemeinsamen phylogenetischen Abstammung. Alle OM-Proteine sind mit einem hydrophoben Teil in der Membran verankert, während ein Teil des Proteins von außen zugänglich ist und als Rezeptor dient. Eine gemeinsame Abhängigkeit der Funktion einiger Rezeptoren von der Energetisierung der OM (TonB Funktion) wurde seit langem festgestellt (83). Es gibt auch Hinweise auf Kooperation der Rezeptoren in der Organisation der OM wie z.B. bevorzugte Stellen für die Phagenadsorption (Bayer, 1968 (84)). Auch eine Regulation der Synthese der OM-Proteine wurde festgestellt z.B. bei der Osmoregulation (85) und bei den fur-Mutanten,die die Eisen-Rezeptoren überexprimieren (86).

Alle oben erwähnten Aspekte verdeutlichen,daß die Charakterisierung der Antigenspezifität,der in dieser Arbeit aufgeführten monoklonalen Antikörper,sehr schwierig war. Sie war nur möglich durch den Vergleich der Ergebnisse aus mehreren Funktionstests und durch die Verwendung von Mutanten,denen bestimmte Proteine der OM fehlen. Für das Testen der Hybridklone nach jeder Fusion, stand also kein positives Selektionsverfahren zur Verfügung. Diese Verfahrensweise war sehr arbeitsintensiv. Deswegen konnten nur drei von mehr als hundert monoklonalen Antikörpern,die mit Escherichia coli Membranantigenen eine positive Reaktion zeigten,charakterisiert werden.

Nachdem durch die Agglutinationsteste festgestellt wurde,daß das Lipoprotein durch die Antikörper der Zellinie LP14 von der Außenseite der OM nicht gut erkennbar ist,wurde versucht,die Spezifität der Antikörper gegen das Lipoprotein näher zu charakterisieren.

Mit dem Hämolyse-Test wurde gezeigt (Tab. 2),daß die Antikörper Erythrozyten lysieren konnten,die mit FLP beschichtet waren.

Auch in der Immunpräzipitation waren die Antikörper in der Lage, Lipoprotein aus der OM-Präparation des Stammes JE5512 auszufällen(Abb. 5). Daß es sich bei der ausgefällten Bande um Lipoprotein handelt,dafür gibt es folgende Hinweise: Erstens kommt diese Bande aus der OM-Präparation. Dies geht aus dem Vergleich aller Kontrollansätze der Abb. 5 hervor. Zweitens ist die ele-

ktrophoretische Lage der Bande die des Lipoproteins. Drittens wurden die Präzipitate der einzelnen Versuchsansätze im ELISA mit spezifischen Kaninchen-anti-LP-Antikörper untersucht. Während alle Kontrollansätze negativ waren,bekam man eine positive Reaktion nur in dem Ansatz,wo OM von JE5512 mit Antikörper der LP14-Linie präzipitiert wurde.

Zusammenfassend kann man für die Antikörper der Zellinie LP14 sagen,daß sie spezifisch mit dem Lipoprotein reagieren (ELISA, Hämolyse-Test). Sie präzipitieren auch das Lipoprotein aus einer OM-Präparation (Immunpräzipitation). Gleichzeitig erkennen sie nur schlecht das Lipoprotein auf der Membran von Escherichia coli (Agglutinationstest). Eine Erklärung dafür wäre die Unzugänglichkeit des Moleküls auf der Oberfläche des Bakteriums. Aus diesem Grund war das Testen dieser Antikörper durch weitere Funktionsteste nicht möglich.

4.3 Antikörper der Zellinie AJ216

Die Maus wurde mit einer OM-Präparation des Stammes H1426 immunisiert. Der Stamm trägt eine fur-Mutation,die für die Überexpression der Eisen-Rezeptoren der OM verantwortlich ist(86). Es war damit beabsichtigt,die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Antikörper zu bekommen,die gegen diese Rezeptoren gerichtet sind. Die OM wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen isoliert(2.2.13). Damit wurde erhofft,daß die Antikörper Antigendeterminanten des nativen Proteins erkennen werden.

Das Testen der Hybridklone erfolgte durch ELISA. Als Antigen diente dieselbe OM-Präparation des Stammes H1426. Der Überstand der Zellinie AJ216 zeigte eine stark positive Reaktion (Extinktionswert 0,7),die auch nach zwei Subklonierungen erhalten blieb. Eine Subklasse Bestimmung ergab die Subklasse IgG2b/kappa.

Wegen der starken Reaktion der Antikörper war zu vermuten,daß sie gegen das LPS gerichtet sind. Dies wurde durch die Ergebnisse der Tab. 10 widerlegt.

Trotz der Überexpression der Eisen-Proteine bei der fur-Mutante waren die Hauptproteine in der OM-Präparation noch stark vorhanden (Abb. 22). Mit dem Agglutinationstest wurde untersucht,ob die Antikörper mit den Hauptproteinen reagieren. Es wurden vier Bakterienstämme eingesetzt,die Unterschiede im Hauptprotein-Muster (OmpF und OmpC) aufweisen. Die Antikörper konnten die Bakterienstämme AB2847, H315 und JWO3O agglutinieren,nicht aber den Stamm 72-6 (Tab. 11).

Wenn man das Proteinbanden-Muster der Stämme mit der Agglutinationsfähigkeit der Antikörper vergleicht(Tab. 11) erkennt man, daß die ausbleibende Agglutination mit dem Stamm 72-6 davon kommt,daß dieser Stamm als einziger fhuA ist. Dies war der Hinweis,daß die Antikörper mit dem nativen FhuA-Rezeptor auf der Oberfläche von E.coli reagieren.

Auch beim ELISA,wobei ganze Bakterien derselben Stämme als Antigen dienten,zeigten die Antikörper die schwächste Reaktion mit dem Stamm 72-6 (Tab. 12).

Die Proteine einer OM-Präparation des Stammes H1426 wurden mittels einer präparativen Gelelektrophorese getrennt. Die Reaktion der Antikörper gegen die einzelnen Fraktionen wurden im ELISA getestet. Eine gute Trennung der Proteine konnte mit dieser Methode,wie in der Abb. 6 deutlich zu sehen ist,nicht erreicht werden. Die Antikörper zeigten eine positive Reaktion mit allen Fraktionen (Tab. 13). Berücksichtigt man die schlechte Trennung der Proteine und ihren denaturierten Zustand nach der Isolierungsmethode,kann man daraus eine Kreuzreaktion der Antikörper mit mehreren denaturierten OM-Proteinen ableiten. Dies erscheint einleuchtend,wenn man die Aspekte berücksichtigt, die auf Seiten 83-85 diskutiert wurden. Diese Reaktion der Antikörper ist deutlich geringer als die mit der nativen OM-Präparation des Stammes H1426. Dies geht aus einem Vergleich der Extinktionswerte hervor.

Eine spezifische Bindung der Antikörper mit den Hauptproteinen OmpF und OmpC konnte dann auch mittels ELISA mit isolierten Proteinen als Antigen ausgeschlossen werden. Der Extinktions-

wert von 0,21 der Antikörper mit der nativen Form dieser Proteine deutet auf eine geringe Kreuzreaktion (Tab. 14). Die Antikörper zeigten keine Reaktion mit FLP und MLP.

Um den Antikörpertiter zu erhöhen,wurden die Antikörper über Protein-A-Sepharose isoliert. Sehr günstig dafür war die Subklasse der Antikörper (IgG2b) und ihr relativ hoher Titer im Kulturüberstand.

Eine Gelelektrophorese der isolierten Antikörper zeigte,daß sie rein vorlagen (Abb. 7). ELISA gab den Hinweis,daß sie verglichen mit dem Kulturüberstand,um den Faktor 200 konzentrierter vorlagen (3.3.3.2). Bei einer Antikörperkonzentration von ca. 5mg/ml in der isolierten Fraktion,war die Voraussetzung geschaffen,sie in Funktionstests einzusetzen.

Vorher wurde mittels ELISA (beschichtet mit ganzen Bakterien) und Agglutinationstest gezeigt (Abb. 8),daß die isolierten Antikörper mit den Stämmen AB2847, H315, JW030 und 72-6 dieselben Ergebnisse lieferten wie der Kulturüberstand.

In Phagenbindungskinetiken mit T5-Phagen an den Stamm W3110 konnte eindeutig gezeigt werden,daß die Adsorptionskonstante der Phage durch die Antikörper um den Faktor 3,5 vermindert wird. Stärker wird die Adsorption der T5-Phagen an den Stamm H0831 verhindert. Bei diesem FhuA-Überproduzentenstamm (78) ergab sich eine Verminderung der Adsorptionskonstante um den Faktor 6,8 (Abb. 9 und 10, Tab. 15).

Interessant war nach diesen Ergebnissen die Frage,ob die Antikörper die Adsorption der Phagen T1 und Ø80 verhindern können, die auch das FhuA-Rezeptorprotein benötigen. Phagenbindungskinetiken ergaben,daß die Adsorption des Phagens T1 durch die Antikörper beeinträchtigt wird (verminderung der Adsorptionskonstante um den Faktor 3,8) aber nicht so stark wie der T5. Die Adsorption des Ø80-Phagens konnte nicht verhindert werden. Es ist bekannt (20),daß die Adsorption der Phagen T1 und Ø80 im gegensatz zu T5 von der Funktion des tonB Genprodukts abhängig ist.

Weitere Phagenbindungskinetiken mit den Phagen T2, T6 und TuIB,die die Rezeptoren OmpF, Tsx und OmpC der OM benutzen, haben folgendes Ergebnis geliefert: Die Adsorption dieser Phagen wurde durch die AJ216 Antikörper auch gehemmt (Abb. 13-18). Die geringe Hemmung ihrer Adsorption (Verminderung der Adsorptionskonstante bei allen drei Phagen um den Faktor 2) verschwand aber,wenn man einen Bakterienstamm benutzte,der fhuA war. Damit wurde deutlich,daß der Grund für die geringe Adsorptionshemmung der drei Phagen nicht die Bindung der Antikörper an die entsprechenden Rezeptoren ist. Diese unspezifische Hemmung wäre gut mit einer sterische Hinderung durch die an den FhuA-Rezeptor gebundenen Antikörper zu erklären.

Die Zahl der FhuA-Rezeptoren an einer E.coli Zelle beträgt zwischen 1000 und 10000. Man muß also annehmen,daß maximal 10000 Antikörpermoleküle an eine Zelle gebunden haben. Jedes Antikörpermolekül deckt eine Fläche von ca. 60 nm^2 ab (87). Rechnet man bei einer E.coli Zelle mit einer Länge von 3µm und einem Durchmesser von 0,8µm,bekommt man eine Oberfläche von $8x10^6$ nm^2. Die 10000 Antikörpermoleküle können also etwas weniger als 10% der Oberfläche abdecken.

Um eine sterische Hinderung der Phagen T2, T6 und TuIb durch die Antikörper zu erklären,muß man unter diesem Aspekt annehmen,daß die Rezeptoren in der OM nicht statistisch verteilt sind. Bayer stellte 1968 (84) eine Theorie auf,in der die Organisation der aktiven Phagenrezeptoren in der Membran als "Cluster" forderte. Für seine Adsorptionsstudien hatte er auch T1, T2, T5 und T6 Phagen benutzt.

Nachdem die Antikörper die Adsorption des Phagens Ø80 nicht beeinträchtigen,muß man daraus folgen,daß dieser Phage die "Cluster"-Struktur für seine Adsorption nicht braucht. Es ist naheliegend,daß der Phage Ø80 an FhuA-Rezeptoren binden kann, die nicht in den aktiven "Cluster" assoziiert sind. Eine unterschiedlich starke Beeinträchtigung der einzelnen Rezeptorfunktionen je nach Zustand eines multifunktionalen Rezeptors wurde im Falle des BtuB-Proteins gezeigt (88).

Weiterhin konnte mittels Kinetiken der Colicin M Wirkung gezeigt werden,daß die Antikörper in der Lage sind,die Zellen vor der Colicin M Abtötung zu schützen (Abb. 19). Die Abtötungsrate konnte mit Antikörper um den Faktor 3,8 verlangsamt werden. Durch Kinetiken der Colicin B Wirkung wurde parallel gezeigt,daß die Antikörper die Zellen vor diesem Colicin nicht schützen können (Abb. 20 und 21).

Da die Antikörper nur an einer Stelle des FhuA-Rezeptors binden können,muß man annehmen,daß dieselbe Determinante des Rezeptors sowohl für die T5 und T1 Adsorption als auch für die Aufnahme von Colicin M notwendig ist. Es bleibt auch die Möglichkeit,daß die Zentren ganz eng benachbart sind,oder daß ihre aktive Konformation durch die Bindung des Antikörpers negativ beeinflußt wird.

Um die Reaktion der Antikörper mit einzelnen OM-Proteinen testen zu können,wurden die Banden einer Gelelektrophorese (OM-Präparation des Stammes H1426) ausgeschnitten,und ELISA Platten damit beschichtet. Die schlechte Trennung der OM-Proteine war ja eines der Hauptprobleme der präparativen Gelelektrophorese (Abb. 6),die auf Seite 85 diskutiert wurde. Trotz der Beschichtung der ELISA-Platten mit einzelnen Proteinbanden,zeigten die Antikörper mit allen eine Reaktion (Tab. 16). Sicher ist,daß nach der SDS-PAGE alle Proteine in denaturiertem Zustand vorliegen. Die Antikörper sind also in der Lage Determinanten zu erkennen,die auf den meisten denaturierten OM-Proteinen vorkommen. Dies sollte man auch erwarten, wenn man die Aspekte heranzieht,die auf Seiten 83-85 diskutiert wurden.

Zusammenfassend kann man für die Antikörper der Zellinie AJ216 folgende Aussagen treffen:

1) Sie binden spezifisch an das FhuA-Rezeptorprotein auf der Oberfläche von Escherichia coli. Sie beeinträchtigen die Adsorption der Phagen T5, T1 und von Colicin M.

2) Daraus ergibt sich,daß die Bindung von T5, T1 und Colicin M

an dieselbe Determinante erfolgt,oder daß die Bindungsstellen ganz eng benachbart oder die Bindung der Antikörper durch Konformationsänderung die Phagen-, bzw. Colicin-Bindungsstellen inaktiviert.

3) Die Adsorption des Phagens Ø80 wird durch die Antikörper nicht gehindert. Seine Bindungsstelle auf dem Rezeptor ist also eine andere als die der Phagen T5, T1 und des Colicins M.

4) Die sterische Hinderung der T2,T6 und TuIb Phagenadsorption durch die Antikörper deutet auf eine Organisation der aktiven Phagenrezeptoren als "Cluster" in der äußeren Membran.

5) Der Phage Ø80 braucht offenbar für seine Adsorption nicht diese "Cluster"-Struktur. Seine Adsorption wird durch die Antikörper überhaupt nicht gehindert.

6) Die Antikörper erkennen Determinanten,die auf den meisten denaturierten Proteinen der äußeren Membran vorkommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Hybridomatechnik wurde für die Produktion von monoklonalen Antikörper gegen Proteine der äußeren Membran von Escherichia coli entwickelt.

Der Enzymimmunassay mit bakteriellen Membranantigenen wurde optimiert,so daß er zum Screening der Klone geeignet war. Es wurden ca. 30 Fusionen durchgeführt. Mit drei der gewonnenen Zellinien wurde weitergearbeitet.

Die Zellinie LP14 produziert Antikörper der Subklasse IgG2a/kappa,die beim ELISA eine Spezifität gegen das Lipoprotein (FLP) zeigen. Die Spezifität dieser Antikörper gegen das Lipoprotein konnte weiterhin mit dem Hämolyse-Test und der Immunpräzipitation gezeigt werden. Der Agglutinationstest machte deutlich, daß das Lipoprotein auf der Membran von Escherichia coli für diese Antikörper nur schlecht zugänglich ist.

Die Zellinie D24 produziert Antikörper gegen das FhuA Rezeptorprotein. Diese Antikörper (Subklasse IgG1/kappa) verhindern die Adsorption der T5-Phagen und schützen die Zellen vor Colicin M. Durch ELISA und Agglutinationstest konnte gezeigt werden,daß die Antikörper nicht mit LPS und den Hauptproteinen reagieren. Durch dialysierte Kulturüberstände konnte der Ferrichrom-Eisen-Transport nicht verhindert werden.

Die Zellinie AJ216 produziert Antikörper der Subklasse IgG2b/kappa,die an den FhuA-Rezeptor binden. Dies wurde mit dem Enzymimmunassay und durch Agglutination gezeigt. Die AJ216-Antikörper wurden durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose gereinigt. Die Antikörper verhindern die Adsorption der Phagen T5 und T1 an den Rezeptor und die Aufnahme von Colicin M. Die Bindung des Phagens Ø80 wird nicht gehemmt. Die Adsorption der Phagen T2, T6 und TuIb wird vermutlich aus sterischen Gründen durch die Bindung der Antikörper an das FhuA-Protein gehemmt. Die Adsorption von Colicin B an das FepA-Protein bleibt unbeeinflußt. Die AJ216 Antikörper reagieren auch mit den meisten Proteine der äußeren Membran,wenn diese denaturiert sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BACHMANN,B.J. (1983) Linkage Map of Escherichia coli K12 Edition 7. Microbiol.Rev. 47, 180-230

2. NEIDHARDT,F.C., VAUGHN,V., PHILLIPS,T.A., BLOCH,P.L. (1983) Gene-Protein Index of Escherichia coli K-12. Microbiol. Rev. 47, 231-284

3. LUGTENBERG,B.,v.ALPHEN,L. (1983) Molekular Architecture and Functioning of the Outer Membran of E.coli and other Gram-negative Bacteria Biochem.Biophys.Acta 737, 51-115

4. LINDLEY,M. (1980) Adhesion of Pathogenic Microorganisms Nature 286, 556-557

5. BRAUN,V. (1975) Covalent Lipoprotein from the Outer Membrane of Escherichia coli Biochem.Biophys.Acta 415, 355-377

6. NAKAE,T., NIKAIDO,H. (1975) Outer Membrane as a Diffusion Barrier in Salmonella typhimurium J.Biol.Chem. 250, 7359--7365

7. HINDENACH,I., HENNING,U. (1975) The Major Proteins of the Escherichia coli Outer Cell Envelope Membrane. Eur.J.Biochem. 59, 207-213

8. SCHNAITMAN,C.A. (1974) Outer Membrane Proteins of Escherichia coli III. Evidence that the Major Protein of Escherichia coli 0111 outer Membrane consists of Four Distinct Polypeptide Species J.Bacteriol. 118, 442-453

9. ICHIHARA,S., MIZUSHIMA,S. (1979) Arrangement of Protein O-8 and O-9 in Outer Membrane of Escherichia coli K12. Existence of Homotrimers and Heterotrimers. Eur.J.Biochem. 100, 321-328

10. HANTKE,K. (1978) Major Outer Membrane Proteins of E.coli K12 Serve as Receptors for the Phage T2 (Protein Ia) and 434 (Protein Ib). Mol.Gen.Genet. 164, 131-135

11. MIZUNO,T., CHOU,M-Y., INOUYE,M. (1983) A Comparative Study on the Genes for Three Porins of the Escherichia coli Outer Membrane. DNA-Sequence of the Osmoregulated ompC Gene. J.Biol.Chem. 258, 6932-6940

12. SKURRAY,R.A., HANCOCK,R.E.W., REEVES,P. (1974) Con⁻ Mutants: Class of Mutants in Escherichia coli K12 Lacking a Major Cell Wall Protein and Defective in Conjugation and Adsorption of a Bacteriophage. J.Bacteriol. 119, 726-735

13. BRAUN,V., REHN,K. (1969) Chemical Characterization,Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipoprotein) of the E.coli Cell Wall.The Specific Effect of Trypsin on the Membrane Structure. Eur.J.Biochem. 10, 426-438

14. BRAUN,V., BOSCH,V. (1972) Repetitive Sequences in the Murein-Lipoprotein of the Cell Wall of Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 970-974

15. BRAUN,V., BOSCH,V. (1972) Sequence of the Murein-Lipoprotein and the Attachement Site of the Lipid. Eur.J.Biochem. 28, 51-59

16. GMEINER,J., KROLL,H., MARTIN,H.H. (1978) The Covalent Rigid-Layer Lipoprotein in Cell Walls of Proteus mirabilis. Eur. J. Biochem. 83, 227-233

17. MELCHERS,F., BRAUN,V., GALANOS,C. (1975) The Lipoprotein of the Outer Membrane of Escherichia coli: A B-Lymphocyte Mitogen. J. Exp. Med. 142, 473-482

18. BESSLER,W.G., SIMON,E. and ROTERING,H. (1980) Mitogenicity of a Lipid-Deficient Lipoprotein from a Mutant Escherichia coli Strain. Infect. Immun. 28, 818-823

19. TOKUNAGA,M., TOKUNAGA,H. and WU,H.C. (1982) Posttranslational Modification and Processing of Escherichia coli Prolipoprotein in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2255-2259

20. BRAUN,V., HANTKE,K. (1981) Bacterial Cell Surface Receptors. In: Ghosh,B.K. (Ed.) Organization of the Procaryotic Cell Membrane. Vol II, 1-74, CRC Press,Boca Raton

21. NIKAIDO,H., NAKAE,T. (1979) The Outer Membrane of Gram-negative Bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 20, 163-250

22. BRAUN,V. (1983) The Iron Transport System of Escherichia coli In: Martonosi,A.N. (Ed.) The Enzymes of Biological Membranes, Vol. 3, Plenum Press,New York

23. BRAUN,V. (1981) Escherichia coli Cells Containing the Plasmid ColV Produce the Iron Ionophore Aerobactin. FEMS Microbiol. Lett. 11, 225-228

24. WARNER,P.J., WILLIAMS,P.H., BINDEREIF,A., NEILANDS,J. (1981) ColV Plasmid-Specified Aerobactin Synthesis by Invasive Strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 33, 540-545

25. FECKER,L., BRAUN,V. (1983) Cloning and Expression of the fhu Genes Involved in Iron(III)-Hydroxamate Uptake of Escherichia coli. J. Bacteriol. 156 (3)

26. WAGEGG,W., BRAUN,V. (1981) Ferric Citrate Transport in Escherichia coli Requires Membrane Receptor Protein FecA. J. Bacteriol. 145, 156-163

27. BRAUN,V., HANTKE,K. (1982) Receptor-Dependent Transport Systems in Escherichia coli for Iron Complexes and Vitamin B_{12}. In: Martonosi,A.N. (Ed.), Membrane and Transport, Vol. 2, 107-113, Plenum Press,New York

28. NEILANDS,J.B. (1982) Microbial Envelope Proteins Related to Iron. Ann. Rev. Microbiol. 36, 285-309

29. KRIEGER-BRAUER,H.J., BRAUN,V. (1980) Functions Related to the Receptor Protein Specified by the tsx-Gene of Escherichia coli. Arch. Microbiol. 124, 233-242

30. HANTKE,K. (1976) Phage T6-Colicin K Receptor and nucleoside Transport in Escherichia coli. FEBS Lett. 70, 109-112

31. RANDALL-HAZELBAUER,L., SCHWARTZ,M. (1973) Isolation of the Bacteriophage Lambda Receptor from Escherichia coli. J. Bacteriol. 116, 1436-1446

32. HOFSTRA,H., DANKERT,J. (1980) Preparation and Quantitative Determination of Antibodies Against Major Outer Membrane Proteins of Escherichia coli 026 K60. J. Gen. Microbiol. 117, 437-447

33. DANKERT,J., HOFSTRA,H. (1978) Antibodies Against Outer Membrane Proteins in Rabbit Antisera Prepared Against Escherichia coli 026 K60. J. Gen. Microbiol. 104, 311-320

34. HOFSTRA,H., DANKERT,J. (1981) Porin from the Outer Membrane of Escherichia coli.Immunological Characterization of Native and Heat-dissociated Forms. J. Gen. Microbiol. 125, 285-292

35. KÖHLER,G., MILSTEIN,C. (1975) Continuos Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity. Nature 256, 495-497

36. HARRIS,H., WATKINS,J.F. (1965) Hybrid Cells Derived from Mouse and Man: Artificial Heterocaryons of Mammalian Cells from Different Species. Nature 205, 640-646

37. GODING,J.W. (1978) Use of Staphylococcal Protein A as a Immunological Reagent. J. Immunol. Meth. 20, 241-253

38. JANSEN,F.K. et al. (1980) High Specific Cytotoxicity of Antibody-Toxin-Hybrid Molecules (Immunotoxins) for Target Cells. Immunol. Lett. 2, 97-102

39. MARTINIS,J., KULL,J.F., FRANZ,G., BARTHOLOMEW,R.M. (1982) Monoclonal Antibodies with Dual Antigen Specificity In: Peeters,H. (Ed.) Protides of the Biological Fluids, Vol. 30, 311-316, Pergamon Press,Oxford

40. KIMURA,K., MASON,T.L., KHORANA,H.G. (1982) Immunological Probes for Bacteriorhodopsin. Identification of Three Distinct Antigenic Sites on the Cytoplasmic Surface. J. Biol. Chem. 257, 2859-2867

41. CARRASCO,N., TAHARA,S.M., PATEL,L., GOLDKORN,T., KABACK,H.R. (1982) Preparation,Charakterization,and Properties of Monoclonal Antibodies Against the Lac Carrier Protein from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6894-6898

42. HANCOCK,R.E.W., WIECZOREK,A.A., MUTHARIA,L.M., POOLE,K. (1982) Monoclonal Antibodies Against Pseudomonas aeruginosa Outer Membrane Antigens: Isolation and Charakterization. Infec. Immun. 37, 166-171

43. HIERNAUX,J., BONA,C.A. (1982) Shared Idiotypes Among Monoclonal Antibodies Specific for Different Immunodominant Sugars of Lipopolysaccharide of Different Gram-negative Bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1616-1620

44. GABAY,J., BENSON,S., SCHWARTZ,M. (1973) Genetic Mapping of Antigenic Determinants on a Membrane Protein. J. Biol. Chem. 258, 2410-2414

45. GABAY,J., SCHWARTZ,M. (1982) Monoclonal Antibody as a Probe for Structure and Function of an Escherichia coli Outer Membrane Protein. J. Biol. Chem. 257, 6627-6630

46. SCHENKMANN,S., COUTURE,E., SCHWARTZ,M. (1983) Monoclonal Antibodies Reveal LamB Antigenic Determinants of Both Faces, of the Escherichia coli Outer Membrane. J. Bacteriol. 155, 1382-1392

47. KÖHLER,G. (1978) Protokoll des EMBO Laboratory on B-Lymphocyte Fusion Basel Institute for Immunology

48. LITTELFIELD,J.W. (1964) Selektion of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. Science 145, 709-710

49. UDENFRIED,S., STEIN,S., BÖHLEN,P., DAIRMAN,W., LEIMGRUBER, W., and WEIGELE,M. (1972) Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids,Peptides,Proteins and Primary Amines in the Picomole Range. Science 178, 871-872

50. LAEMLI,U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 217, 680-685

51. LUGTENBERG,B., MEIJERS,J., PETERS,R., van der HOEK,P., and van ALPHEN,L. (1975) Elektrophoretic Resolution of the Major Outer Membrane Protein of Escherichia coli K12 into four Bands. FEBS Lett. 58, 254-258

52. ZAMAN,Z., VERWILGHEN,R.L. (1979) Quantitation of Proteins Solubilized in Sodium Dodecyl Sulfate-Mercaptoethanol-Tris Elektrophoresis Buffer. Anal. Biochem. 100, 64-69

53. BRAUN,V., WOLFF,H., (1973) Charakterization of the Receptor Protein for Phage T5 and Colicin M in the Outer Membrane of Escherichia coli B. FEBS Lett. 34, 77-80

54. SCHNAITMAN,C.A. (1971) Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of Escherichia coli by Triton X-100. J. Bacteriol. 108, 545-552

55. HANTKE,K., Persönliche Mitteilung

56. MAURER,P.H., CALLAHAN,H.J. (1980) Proteins and Polypeptides as Antigens. Meth. Enzymol. 70, 49-69

57. FAZEKAS,DE ST., GROTH,S., SCHEIDEGGER,D. (1980) Production of Monoclonal Antibodies: Strategy and Tactics. J. Immunol. Methods 35, 1-21

58. GALFRE,G., MILSTEIN,C. (1981) Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. Meth. Enzymol. 73, 3-46

59. KNUTTON,S., PASTERNAK,C.A. (1979) The Mechanism of Cell-Cell Fusion. Trends Biochem. Sci. 4, 220-223

60. KÖHLER,G. (1979) Soft Agar Cloning of Lymphoid Tumor Lines. Detection of Hybrid Clones with the Anti-SRBC-Activity. In: Lefkovits,J., Pernis,B.(Eds.) Immunological Methods, 397-401, Academic Press,New York

61. Mc KERN,T.J. (1980) Cloning of Hybridoma Cells by Limiting Dilution in Fluid Phase. In: Kennett,R.H., Mc Kern,T.J., Bechtol,K.B. (Eds.) Monoclonal Antibodies. Plenum Press, New York and London, 375

62. LERNHARDT,W., ANDERSSON,J., COUTINHO,A., MELCHERS,F. (1978) Cloning of Murine Transformed Cell Lines in Suspension Cultures with Efficiencies near 100%. Exp. Cell Res. 111, 309-316

63. POTTER,M. (1972) Propagation and Groth of Plasmacytomas, In: Potter,M.(Ed.), Mouse Tumors and Myeloma Proteins. Physiol. Rev. 52, 661-662

64. VOLLER,A., BIDWELL,D., BARTLETT,A. (1976) Microplate Enzyme Immunoassay for the Immundiagnosis of Virus Infections. In: Rose,N.R., Friedman,M. (Eds.), Manual of Clinical Immunology, 506-512, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

65. ENGVALL,E. (1980) Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. Meth. Enzymol. 70, 419-439

66. BULLOCK,S.L., WALLS,K.W. (1977) Evaluation of some of the Parameters of the Enzyme-Linked Immunospecific Assay. J. Infectious Dis. 136, Supplement, S279-285

67. NACHAMKIN,J., CANNON,J.G., MITTLER,R.S. (1981) Monoclonal Antibodies Against Neisseria gonorrhoeae: Production of Antibodies Directed Against a Strain-specific Cell Surface Antigen. Infect. Immun. 32, 641-648

68. HELLER,K., BRAUN,V. (1979) Accelerated Adsorption of Bacteriophage T5 to Escherichia coli F, Resulting from Reversible Tail Fiber-Lipopolysaccharide Binding. J. Bacteriol. 139, 32-38

69. BRAUN,V., HANCOCK,R.E.W., HANTKE,K., HARTMANN,A. (1976) Functional Organization of the Outer Membrane of E.coli: Phage and Colicin Receptors as Components of Iron Uptake Systems. J. Supramol. Struct. 5, 37-58

70. HARTMANN,A. (1980) Mechanismus der Ferrichrom- und Albomycinaufnahme in Escherichia coli K12. Dissertation, Universität Tübingen

71. WEIR,D.M. (1978) Handbook of Experimental Immunology (Third Edition), Blackwell Scientific Publications, Oxford

72. TAM,M.R., et. al. (1982) Serological Classification of Neisseria gonorrhoeae with Monoclonal Antibodies. Infect. Immun. 36, 1042-1053

73. HANTKE,K., Persönliche Mitteilung

74. MOLLNER,S. (1980) Lyseresistente Mutanten von Escherichia coli. Diplomarbeit, Universität Tübingen

75. ROLLINGER,W. (1983) Untersuchungen zur Lipidsynthese des Lipoproteins von Escherichia coli. Dissertation, Universität Tübingen

76. GALANOS,C., LÜDERITZ,O., WESTPHAL,O. (1969) A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 9, 245-249

77. MILSTEIN,C. (1980) Monoklonale Antikörper, Spektrum der Wissenschaft. Heft Dez. 1980, 97-108

78. HOFFMANN,H. (1983) Isolierung des FhuA(TonA) Proteins aus der äußeren Membran eines Escherichia coli Stammes mit vielfacher Genkopie. Diplomarbeit, Universität Tübingen

79. Mc CORQUODALE,D.J. (1975) The T-odd Bakteriophages, Crit. Rev. Microbiol. 4, 101-159

80. BRAUN,V., BOSCH,V., KLUMPP,E.R., NEFF,I., MAYER,H., SCHLECHT,S. (1976) Antigenic Determinats of Murein Lipoprotein and Its Exposure at the Surface of Enterobacteriaceae. Eur. J. Biochem. 62, 555-566

81. ICHIHARA,S., HUSSAIN,M., and MIZUSHIMA,S. (1981) Characterization of New Membrane Lipoproteins and Their Precursors of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 256,3125-3129

82. LANE,D., KOPROWSKI,H. (1982) Molecular Recognition and the Future of Monoclonal Antibodies. Nature 296, 200-202

83. HANTKE,K., BRAUN,V. (1978) Functional Interaction of the TonA/TonB Receptor System in Escherichia coli. J. Bacteriol. 135, 190-197

84. BAYER,M.E. (1968) Adsorption of Bacteriophage to Adhesions Between Wall and Membrane of Escherichia coli. J. Virol. 2, 346-356

85. TAYLOR,R.K., HALL,M.N., ENQUIST,L., SILHAVY,T.J. (1981) Identification of OmpR: A Positive Regulatory Protein Controlling Expression of the Major Outer Membrane Matrix Porin Proteins of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 147, 255-258

86. HANTKE,K. (1981) Regulation of Ferric Iron Transport in Escherichia coli K12. Isolation of a Constitutive Mutant. Mol. Gen. Genet. 182, 288-292

87. VALENTINE,R.C., GREEN,N.M. (1967) Electron Microscopy of an Antibody-Hapten Complex. J. Mol. Biol. 27, 615-617

88. BASSFORD,P.J., Jr., KADNER,R.J., and SCHNAITMANN,C.A. (1977) Biosynthesis of the Outer Membrane Receptor for Vitamin B12, E Colicins,and Bacteriophage BF23 by Escherichia coli: Kinetics of Phenotypic Expression After Introduction of the bfe^{+} and bfe Alleles. J. Bacteriol. 129, 265

89. ROTMAN,B., PAPERMASTER,B.W. (1966) Membrane Properties of Living Mammalian Cells as Studied by Enzymatic Hydrolysis of Fluorogenic Esters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 134-141

LEBENSLAUF

	Nikolaos Dimoudis
	geboren am 21.September 1955 in
	Pyrgos-Thessaloniki/GR
1961-1963	Besuch der Volksschule in Thessaloniki
1963-1967	Besuch der griechischen & Deutschen Volksschule in Kornwestheim und Ludwigsburg
1967-1973	Besuch des Ersten Gymnasiums in Thessaloniki
Juni 1973	Abitur
Sept.1974	Prüfung zur Feststellung der Deutschen Hochschulreife in Stuttgart
ab WS 1974	Studium der Biologie,Diplom an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
25.4.1977	Zeugnis der Diplomvorprüfung
9.10.1980	Zeugnis der Diplom-Hauptprüfung in Biologie.Hauptfach Mikrobiologie. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie II,Universität Tübingen mit dem Titel: "Monoklonale Antikörper gegen Proteine der äußeren Membran von Escherichia coli"
Okt.1980 bis Jan.1984	Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof.Dr.V.Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

D.Ammermann, E.Bayer, F.W.Bentrup, W.Bessler, H.Biessmann, V.Braun, W.Braun, D.Bunke, F.Gönnenwein, K.G.Grell, J.Guglielmi, K.P.Hadeler, H.Hagenmaier, A.Hager, K.Hantke, V.Hemleben, W.Löffler, D.Mecke, K.Mörike, F.Oberwinkler, W.Rähle, A.Rieker, B.Schwemmle, H.Seiler, W.Seyffert, J.Strähle, G.Weitzel, G.Winkelmann, H.Zähner